

# **Biologische Wirkungen der Aktivierung des Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptors**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaft  
(Dr. rer. nat.)  
der naturwissenschaftlichen Fakultät IV  
Chemie und Pharmazie  
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von  
Peter Stopfer  
aus Viechtach  
2003**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von August 2000 bis April 2003 unter  
Anleitung von Frau Prof. Dr. D.N. Männel am Institut für  
Pathologie/Tumorimmunologie des Klinikums der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am:

07.05.2003

Die Arbeit wurde geleitet von

Prof. Dr. A. Buschauer

Prof. Dr. D.N. Männel

Prüfungsausschuß:

Prof. Dr. S. Elz (Vorsitz)

Prof. Dr. A. Buschauer

Prof. Dr. D.N. Männel

Prof. Dr. A. Göpferich

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 LT $\beta$ R/LT-Liganden-System	1
1.2 Colitis Ulcerosa	9
1.3 Die Mastzelle	13
1.4 Ziel der Arbeit	17
<b>2. Material</b>	<b>18</b>
2.1 Chemikalien und Reagenzien	18
2.2 Verbrauchsmaterial und Geräte	19
2.3 Kits	20
2.4 Molekulargewichtsstandards	21
2.5 Antikörper und Enzyme	21
2.6 Oligonukleotide	22
2.7 Puffer und Lösungen	23
2.8 Zelllinien	25
2.9 Zytokine	25
2.10 Tiere	25
<b>3. Methoden</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Arbeiten mit RNA</b>	<b>26</b>
3.1.1 Isolierung von total-RNA aus Zellen	26
3.1.2 Isolierung von total-RNA aus Darmgewebe	26
3.1.3 Reverse Transkription	27
<b>3.2 Arbeiten mit DNA</b>	<b>27</b>
3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
3.2.2 Agarose Gelelektrophorese	28
3.2.3 Quantitative RT-PCR mittels Light Cycler	28
3.2.4 Southern Blot	29
<b>3.3 Proteinchemische Methoden</b>	<b>30</b>
3.3.1 Das LT $\beta$ R:Ig-Fusionsprotein	30
3.3.2 Reinigung von LT $\beta$ R:Ig-Fusionsprotein aus Zellkulturüberstand	30
3.3.3 Messung der Proteinkonzentration	30
3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
3.3.5 Coomassie-Färbung	31
3.3.6 WesternBlot	32
3.3.7 Biotinylierung von Antikörpern	32
3.3.8 FITC-Markierung von Proteinen	33
<b>3.4 Zellbiologische Methoden</b>	<b>33</b>
3.4.1 Zellkulturbedingungen	33
3.4.2 Zellkulturmedien	33
3.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	34
3.4.4 Bestimmung der Lebendzellzahl	34
3.4.5 Mycoplasmentest	34
3.4.6 Experimente mit primären vom Knochenmark stammenden polyklonalen Mastzellen (Bone marrow-derived mast cells = BMMC)	34
3.4.6.1 Gewinnung und Kultur von BMMC	34
3.4.6.2 Selektion und Kultur von Mastzellen	35
3.4.6.3 Zytozentrifugenpräparate	35
3.4.6.4 May-Grünwald-Giemsa-Färbung	35
3.4.6.5 Toluidinblau-Färbung	35
3.4.6.6 Induktionsexperimente	35

3.4.6.7 Cokultorexperimente mit aktivierten T-Zellen und BMMC.....	36
3.4.6.8 $\beta$ -Hexosaminidase Freisetzung.....	36
3.4.7 Gewinnung einer Zellsuspension aus mesenterialen Lymphknoten.....	37
3.4.8 Durchflußzytometrie.....	37
3.4.8.1 Allgemeine Durchflußzytometrie.....	37
3.4.8.2 Durchflußzytometrie von BMMC.....	38
<b>3.5 Immunologische Methoden.....</b>	<b>38</b>
3.5.1 Allgemeine ELISA-Methode.....	38
3.5.2 ELISA zur Quantifizierung von mLT $\beta$ R:Ig-Titern in Seren.....	38
3.5.3 ELISAs zur Quantifizierung von IL-4, IL-6, MIP-2, TNF und RANTES.....	39
3.5.4 Serumgewinnung aus Mausblut.....	39
<b>3.6 Immunohistochemische Verfahren.....</b>	<b>39</b>
3.6.1 MadCAM-1-Färbung von Musedickdarm.....	39
3.6.2 PNA-Färbung von Musedickdarm.....	40
3.6.3 Follikulär Dendritische Zellen (FDC)-Färbung von Mausmilz.....	40
<b>3.7 Mäuse.....</b>	<b>41</b>
<b>3.8 Induktion einer experimentellen akuten und chronischen Colitis mit Dextransulfat (DSS).....</b>	<b>41</b>
3.8.1 Induktion einer experimentellen akuten Colitis.....	41
3.8.2 Induktion einer experimentellen chronischen Colitis.....	42
<b>3.9 Bestimmung von Entzündungsparametern des Dickdarmes.....</b>	<b>42</b>
3.9.1 Histologischer Score.....	43
3.9.2 Lymphfollikel-Score.....	43
3.9.3 Gewichtsveränderung.....	43
3.9.4 Myeloperoxidase-Aktivität.....	44
3.9.5 Dickdarmlänge.....	44
<b>3.10 In vivo Fluoreszenzmikroskopie.....</b>	<b>44</b>
<b>3.11 Statistik.....</b>	<b>45</b>
 <b>4. Ergebnisse .....</b>	 <b>46</b>
<b>4.1 Reinigung und Test der biologischen Aktivität des LT<math>\beta</math>R:Ig-Fusionsproteins.....</b>	<b>46</b>
4.1.1 LT $\beta$ R:Ig-Fusionsprotein.....	46
4.1.2 Reinigung .....	46
4.1.3 Bindungsfähigkeit an aktivierte T-Zellen <i>in vitro</i> .....	47
4.1.4 Biologische Aktivität .....	48
4.1.5 Pharmakokinetik .....	49
<b>4.2 Hemmung der LT<math>\beta</math>R-Aktivierung in gesunden Mäusen.....</b>	<b>50</b>
4.2.1 Einfluss auf Entzündungsparameter des Dickdarms.....	50
4.2.1.1 Histologie und histologischer Score.....	50
4.2.1.2 Lymphfollikel-Score.....	52
4.2.1.3 Gewichtsverlust.....	52
4.2.1.4 Myeloperoxidase-Aktivität.....	52
4.2.1.5 Dickdarmlänge.....	53
4.2.2 LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT-Expression von mesenterialen Lymphozyten.....	54
4.2.3 Zytokinexpression von mesenterialen Lymphozyten.....	55
<b>4.3 Hemmung der LT<math>\beta</math>R-Aktivierung bei Mäusen mit akuter DSS-induzierter Colitis.....</b>	<b>56</b>
4.3.1 Einfluss auf Entzündungsparameter des Dickdarms.....	56
4.3.1.1 Histologie und histologischer Score.....	56
4.3.1.2 Lymphfollikel-Score.....	59
4.3.1.3 Gewichtsverlust.....	60
4.3.1.4 Myeloperoxidase-Aktivität .....	60
4.3.1.5 Dickdarmlänge.....	61
4.3.2 LT $\beta$ R/LT-Liganden-Expression im Dickdarm .....	62
4.3.3 LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT-Expression auf mesenterialen Lymphozyten .....	63

4.3.4 Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Dickdarmgewebe.....	64
4.3.5 Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten.....	65
<b>4.4 Akute DSS-induzierte Colitis in LT<math>\beta</math>R-/- Mäusen.....</b>	<b>66</b>
4.4.1 Einfluss auf Entzündungsparameter des Dickdarms .....	66
4.4.1.1 Histologie und histologischer Score.....	66
4.4.1.2 Lymphfollikel-Score.....	68
4.4.1.3 Gewichtsverlust.....	69
4.4.1.4 Dickdarmlänge.....	70
4.4.2 LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT-Expression auf mesenterialen Lymphozyten.....	70
4.4.3 Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Dickdarmgewebe.....	70
4.4.4 Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten .....	71
<b>4.5 Hemmung der LT<math>\beta</math>R Aktivierung bei Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis.....</b>	<b>72</b>
4.5.1 Einfluss auf Entzündungsparameter des Dickdarms .....	72
4.5.1.1 Histologie und histologischer Score.....	72
4.5.1.2 Lymphfollikel-Score.....	74
4.5.1.3 Gewichtsverlust.....	75
4.5.1.4 Myeloperoxidase-Aktivität.....	75
4.5.1.5 Dickdarmlänge.....	76
4.5.2 LT $\beta$ R/LT-Liganden-Expression im Dickdarm .....	77
4.5.3 LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT-Expression auf mesenterialen Lymphozyten .....	78
4.5.4 Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Dickdarmgewebe.....	79
4.5.5 Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten .....	80
4.5.6 Expression von Adhäsionsmolekülen nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung im Dickdarm von Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis.....	81
4.5.6.1 Expression von MadCAM-1 im Dickdarm nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung.....	81
4.5.6.2 Expression von PNA $\alpha$ im Dickdarm nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung .....	82
4.5.7 Expression der Liganden der Adhäsionsmoleküle auf mesenterialen Lymphozyten nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung .....	82
4.5.8 „rolling“, „sticking“ und Extravasation von Lymphozyten nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung.....	83
4.5.8.1 „rolling“ und „sticking“ von Lymphozyten in Sammelvenolen nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung.....	84
4.5.8.2 „rolling“ und „sticking“ von Lymphozyten in Postkapillarvenolen nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung.....	86
4.5.8.3 Anhaften und Extravasieren von Lymphozyten in der Mukosa nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung .....	88
4.5.9 Kombinationsbehandlung mit LT $\beta$ R:Ig und anti-IFN $\gamma$ .....	89
<b>4.6 Chronische DSS-induzierte Colitis in LT<math>\beta</math>R-/- Mäusen.....</b>	<b>90</b>
4.6.1 Einfluss auf Entzündungsparameter des Dickdarms .....	90
4.6.1.1 Histologie und histologischer Score.....	90
4.6.1.2 Lymphfollikel-Score.....	92
4.6.1.3 Dickdarmlänge.....	93
4.6.2 MadCAM-1-Färbung im Dickdarm .....	93
<b>4.7 Expression und Funktionalität des LT<math>\beta</math>R auf BMMC.....</b>	<b>95</b>
4.7.1 Mastzellspezifität der BMMC.....	95
4.7.1.1 May-Grünwald- und Toluidinblau-Färbung.....	95
4.7.1.2 FACS-Analyse der BMMC auf CD117-Expression.....	95
4.7.2 Nachweis der LT $\beta$ R-Expression auf BMMC.....	96
4.7.2.1 FACS-Analyse.....	96
4.7.2.2 PCR-Analyse.....	97
4.7.3 mLIGHT- und 5G11b-Stimulierung von Ionomycin aktivierten BMMC.....	98
4.7.3.1 Zytokinfreisetzung .....	98
4.7.3.2 Degranulation.....	101
4.7.4 Kokultivierungsexperimente von BMMC mit aktivierten T-Zellen.....	102
4.7.4.1 Zytokinfreisetzung aus BMMC.....	102

4.7.4.2 Degranulation von BMMC.....	105
4.7.4.3 Zytokinfreisetzung von BMMC nach Blockade von $LT\alpha_1\beta_2$ /LIGHT auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen .....	106
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>108</b>
5.1 Auswirkungen einer $LT\beta R$ -I- Behandlung bei gesunden Mäusen....	108
5.2 Rolle der $LT\beta R$ -Aktivierung in der DSS-induzierten Colitis.....	108
5.2.1 Rolle der $LT\beta R$ -Aktivierung in der akuten Phase der DSS-induzierten Colitis.	108
5.2.2 Rolle der $LT\beta R$ -Aktivierung in der chronischen Phase der DSS-induzierten Colitis.....	113
5.3 Expression und Funktionalität des $LT\beta R$ auf BMMC.....	118
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>122</b>
6.1 Rolle des $LT\beta R$ in der akuten DSS-induzierten Colitis.....	122
6.2 Rolle des $LT\beta R$ in der chronischen DSS-induzierten Colitis.....	122
6.3 Expression und Funktionalität des $LT\beta R$ auf BMMC.....	123
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>125</b>
<b>8. Abkürzungen.....</b>	<b>139</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>141</b>
<b>10. Publikationen.....</b>	<b>142</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1 Das LT $\beta$ R/LT-Rezeptor-Liganden System**

Der Lymphotoxin-beta-Rezeptor (LT $\beta$ R) ist Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie (Tabelle 1-1). Das allen Mitgliedern der TNF-Rezeptorfamilie gemeinsame Strukturmerkmal sind 1 – 6 cysteinreiche Motive in der Extrazellulärdomäne, die wesentlich zur Ligandenbindung beitragen (Lotz, 1996). Mit Ausnahme des TRAIL-Rezeptor 3 und OPG sowie der viralen Rezeptoren sind alle TNFR-Familienmitglieder Typ I Membranproteine (Smith, 1994). Kristallisationsexperimente mit TNFR1 und LT $\alpha_3$  als Ligand zeigten, dass sich bei Ligandenbindung drei Rezeptormoleküle zu einem Trimer zusammenlagern, wobei ein Einzelrezeptor ein langgestrecktes Molekül bildet, das in die Grube zwischen zwei LT $\alpha$ -Molekülen bindet (Banner, 1993). Trimere Rezeptorkomplexe können miteinander interagieren, so dass größere Rezeptorcluster entstehen. Bei Abwesenheit des Liganden ist die Dimerisierung der intrazellulären Domänen durch entsprechende Stellung der extrazellulären Rezeptordomänen verhindert (Naismith, 1995). Eine konservierte Struktur und Konformation findet sich auch auf Seite der Liganden. Diese sind i.d.R. Typ II Membranproteine (Ausnahme z.B. LT $\alpha$ ), die als Monomere durch eine achtegliedrige  $\beta$ -Faltblattstruktur gekennzeichnet sind. Funktionelle Homo- oder Heterotrimere werden hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert (Lotz, 1996).

Abhängig vom Vorhandensein der sogenannten „Todesdomäne“ („death domain“, abgekürzt „DD“) in der intrazellulären Domäne, lassen sich die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie in zwei Gruppen untergliedern, wobei der TNFR1, Fas, Apo3, NGFR und die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 zu den DD-Proteinen zählen (Magnusson, 1999).

Innerhalb der TNF/TNFR Ligand-Rezeptorfamilie bilden TNF, LT $\alpha$ , LT $\beta$  und LIGHT als Liganden bzw. TNFR1, TNFR2, LT $\beta$ R und HVEM als Rezeptoren wegen ihrer zwar individuellen, jedoch teilweise überlappenden Bindungseigenschaften eine Gruppe. Während TNF seine biologische Aktivität über die beiden Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 vermittelt, weisen die übrigen Liganden dieser Gruppe ein vergleichsweise komplexes Bindungsmuster auf. Die bisher beobachteten Bindungen dieser Liganden an die Rezeptoren sind schematisch in Abbildung 1-1 dargestellt.

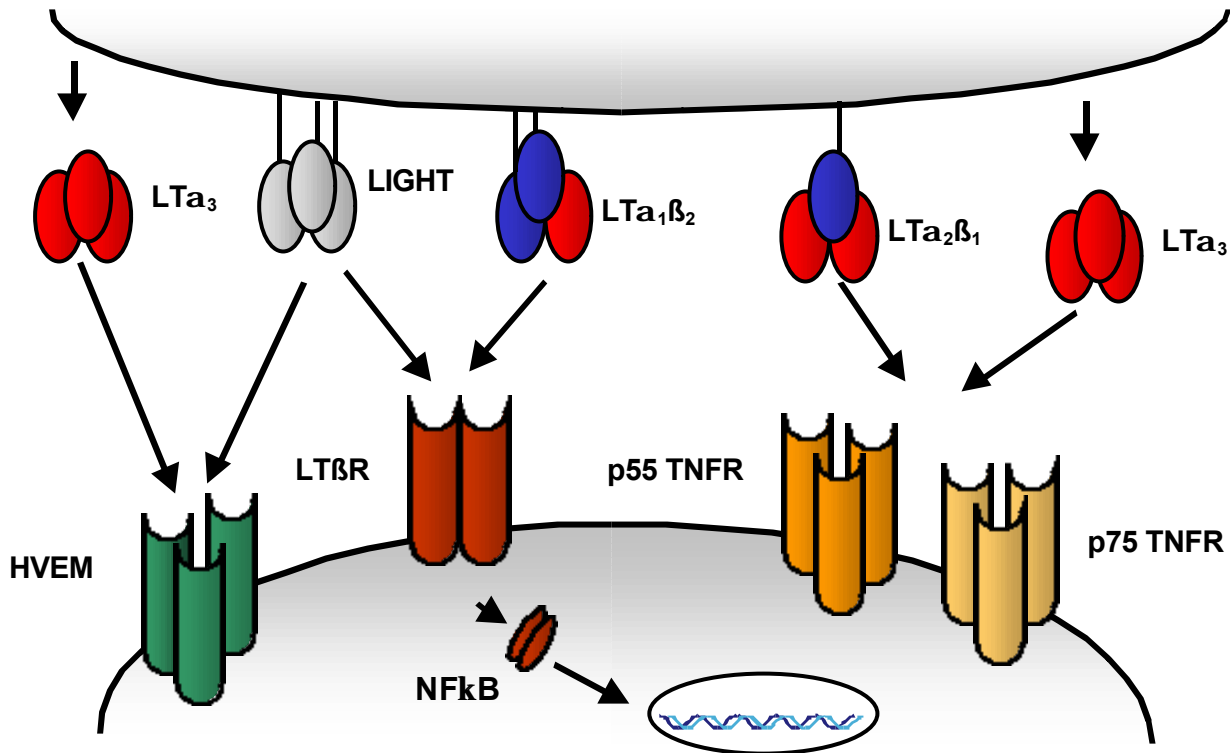


Rezeptor	Ligand
TNFR1 (p55 TNFR)	TNF (TNF $\alpha$ ), LT $\alpha$ (TNF $\beta$ )
TNFR2 (p75 TNFR)	TNF, LT $\alpha$
icp75	TNF
LT $\beta$ R	LT $\alpha$ / LT $\beta$ , LIGHT
HVEM (ATAR, TR2)	LIGHT, LT $\alpha$ / LT $\beta$
NGFR	NGF
OX40	OX40L
CD40 (CD154, gp39, TRAP)	CD40L
Fas (CD95)	FasL (CD95L, Apo1L)
CD27	CD27L (CD70)
CD30	CD30L
TRAILR1 (DR4)	TRAIL (Apo2L)
TRAILR2 (DR5, KILLER)	TRAIL (Apo2L)
TRAILR3 <sup>1</sup> (DcR1, TRAD)	TRAIL (Apo2L)
TRAILR4 (DcR2)	TRAIL (Apo2L)
DcR3 (TR3)	LIGHT, LT $\alpha$ / LT $\beta$ , FasL
OPG <sup>2</sup>	OPGL (TRANCE, RANKL), TRAIL (Apo2L)
TRANCE (RANK)	TRANCE (OPGL, RANKL)
Apo3 (DR3, LARD, TRAMP)	TWEAK (Apo3L, DR3L)
?	APRIL (TALL-2)
?	VEGI
GITR	GITRL (AITRL, TL6)
CD137 (ILA, 4-1BB)	CD137L (4-1BBL)
SFV-T2 <sup>3</sup> (PV-T2)	TNF
Va53 <sup>3</sup> (PV-A53R)	TNF
G4RG <sup>3</sup>	TNF
CrmB <sup>3</sup> , CrmC <sup>3</sup> , CrmD <sup>3</sup>	TNF

<sup>1</sup>Löslicher Rezeptor  
<sup>2</sup>Mit Glykophospholipid-Anker  
<sup>3</sup>Lösliche, virale Proteine

**Tabelle 1-1:**

**Übersicht über die aktuell bekannten Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie sowie der jeweiligen Liganden.** Existieren für einen Rezeptor mehrere verschiedene Liganden sind diese durch Kommata voneinander getrennt. In Klammern sind die in der Literatur verwendeten alternativen Namen für die Rezeptoren und Liganden angegeben.



**Abbildung 1-1: Übersicht über die Moleküle des LT/LT $\beta$ R-Systems und deren Interaktionen.**

Lymphotoxin kommt in zwei Formen vor: LT $\alpha$  und LT $\beta$ . LT $\alpha$ , nach seiner Entdeckung zunächst noch TNF $\beta$  genannt (Aggarwal, 1983 und 1985), ist ein 25kD Glykoprotein und liegt in löslicher Form als Homotrimer (LT $\alpha_3$ ) vor (Mackay, 1997). Zusammen mit LT $\beta$  kann es die beiden heterotrimeren Formen LT $\alpha_1\beta_2$  und LT $\alpha_2\beta_1$  bilden, wobei erstere als Hauptexpressionsform auf der Zelloberfläche gilt (Androlewicz, 1992; Browning, 1995). Durch LT $\beta$ , das ein 33kD Typ II Transmembranprotein ist (Browning, 1993), werden die heterotrimeren Komplexe in der Zellmembran verankert. Ein homotrimeres LT $\beta_3$  Molekül konnte bisher nicht identifiziert werden und auch rekombinant exprimiertes LT $\beta$  bildet *in vitro* nur schlecht Trimere (Browning, 1996). LIGHT dagegen, ein 25kD TypII Transmembranprotein, bildet auf der Zelloberfläche Homotrimere (Mauri, 1998; Harrop, 1998). Auf Aminosäureebene beträgt die Identität zwischen LIGHT und LT $\beta$  34% (Zhai, 1998).

Für LT $\alpha_1\beta_2$  wurde LT $\beta$ R als spezifischer Rezeptor gefunden (Crowe, 1994) und dessen Interaktion mit dem Liganden eingehend untersucht (Browning, 1995, 1996). Während die durch LT $\alpha_1\beta_2$  ausgelösten Signalkaskaden weitgehend bekannt sind, ist noch unklar, ob LT $\alpha_2\beta_1$  Rezeptor-aktivierende Eigenschaften besitzt und ob es *in vivo* überhaupt in ausreichender Menge vorliegt. LT $\beta$ R war auf Grund seiner Homologie zu den beiden TNFR (TNFRI: 41%; TNFRII: 46%) ursprünglich als „TNFR-related protein“ veröffentlicht worden

(Baens, 1993). Mit der Entdeckung von LIGHT, dem spezifischen Liganden für HVEM (Harrop, 1998; Mauri, 1998), wurde noch ein weiterer Bindungspartner für LT $\beta$ R gefunden (Mauri, 1998), der den LT $\beta$ R zu NF $\kappa$ B abhängiger IL-6 und MIP-2 Produktion aktivieren kann (Hehlgans, 2003).

Die Komplexizität der in Abbildung 1-1 dargestellten Bindungsverhältnisse ist noch größer. So wurde ein bereits bekannter löslicher Decoy-Rezeptor (DcR3, TR6), der LIGHT aber auch FasL binden kann (Yu, 1999), aus Gründen der Übersichtlichkeit und weil bisher keine Daten zu seiner physiologischen Bedeutung vorliegen, nicht dargestellt. Über seine Interaktion mit LT $\alpha$ / $\beta$ -Komplexen ist nichts bekannt.

Im Gegensatz zu vielen anderen Ligand/Rezeptor-Systemen der TNF/TNF-Rezeptorfamilie, zeichnet sich das LT/LT $\beta$ R-System durch eine strikte Trennung von Liganden und Rezeptor hinsichtlich der zellulären Expression aus. Bisher gibt es keine Hinweise auf das gleichzeitige Vorhandensein von Ligand und Rezeptor auf ein und derselben Zelle. LT $\beta$ R-Transkripte findet man bei der Maus in allen größeren Organen sowie in Lymphknoten vor allem auf Stromazellen. T- und B-Zelllinien exprimieren den LT $\beta$ R nicht (Force, 1995; Murphy, 1998; Browning, 2002). In der humanen, fötalen Milz konnten die Stromazellen an der Grenze zwischen roter und weißer Pulpa mit anti-huLT $\beta$ R-Antikörpern gefärbt werden (Murphy, 1998). In beiden Organen geht die Anwesenheit LT $\beta$ R-positiver Zellen während der Embryogenese der Ausbildung der jeweils organspezifischen Kompartimentierung voraus. Im Mausfötus konnte bereits am Tag 7 nach der Befruchtung mLT $\beta$ R-Transkripte nachgewiesen werden (Nakamura, 1995). Bemerkenswert ist, dass der LT $\beta$ R an Stellen exprimiert ist, wo ständig Interaktion mit T-Zellen, also Zellen, die nach Aktivierung den LT $\alpha_1\beta_2$ -Liganden tragen, stattfindet. Nach den bisherigen Veröffentlichungen wird der LT $\beta$ R konstitutiv exprimiert (Browning, 1996; Force, 1995).

Im Gegensatz dazu ist die Expression der Ligandenmoleküle LT $\alpha$  und LT $\beta$  auf T- und B-Zelllinien stark reguliert und durch PMA mit oder ohne Ionomycin induzierbar (Browning, 1991; Millet, 1994; Pauli, 1994). Auf aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen konnten die Ligandenmoleküle nachgewiesen werden (Ohshima, 1999; Ware, 1992, 1995; Mapara, 1994; Abe, 1992; Yasukawa, 1993), wobei auf aktivierten T-Zellen die LT $\alpha_1\beta_2$ -Form überwiegt (Androlewicz, 1992; Browning, 1995). Eine neuere Arbeit (Gramaglia, 1999) zeigt, dass LT $\alpha$ / $\beta$  auf peripheren, naiven T-Zellen nach Peptid/MHC-Aktivierung des T-Zellrezeptors ohne weitere Costimulation vorliegt. Vor allem bei chronischen Entzündungen, wie chronisch entzündlicher Darmkrankheit (CED), wird LT $\beta$  vermehrt auf aktivierten T-Zellen und Plasmazellen gefunden (Agyekum, 2003).

LT $\beta$  wird nur als Heterotrimer zusammen mit LT $\alpha$  an die Zelloberfläche gebracht (Koni, 1997; Williams-Abbott, 1997; Kuprash, 2002). Es gibt Spekulationen, wonach LIGHT, als homotrimeres Oberflächenmolekül, die Stelle des nicht-existenten LT $\beta_3$  einnimmt (Williams-

Abbott, 1997). Sein Expressionsmuster ist dem von  $LT\alpha/\beta$  sehr ähnlich. So findet man LIGHT auf IL-3/anti-CD3-Antikörper-stimulierten mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) und PMA-stimulierten monozytären Zelllinien (U937, THP1 u.a.) (Mauri, 1998; Zhai, 1998). Im Unterschied zu  $LT\alpha$ , kann LIGHT in  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  T-Zellen nur mit einer Kombination aus PMA bzw. PHA und Ionomycin induziert werden (Mauri, 1998). Dies lässt auf einen unterschiedlichen Aktivierungsgrad als Voraussetzung für die Expression beider Moleküle schließen.

Im Vergleich zum  $LT\alpha\beta/LT\beta R$ -System ergeben sich für das LIGHT/HVEM-System zwei deutliche Unterschiede: Erstens können LIGHT und HVEM von derselben Zelle exprimiert werden. Zweitens ergibt sich für  $LT\beta R$  und HVEM in bestimmten Bereichen ein gegensätzliches Expressionsmuster. So findet man HVEM auf aktivierten T-Zellen (Montgomery, 1996; Mauri, 1998), während der  $LT\beta R$  gerade auf diesen Zelltypen nicht exprimiert wird. Darüber hinaus wurde HVEM aber auch auf der T-Zelllinie „Jurkat“ sowie in lymphozytenreichen fötalen und adulten Geweben (Montgomery, 1996; Marsters, 1997) detektiert.

Der  $LT\beta R$  gehört wie auch TNFRII und HVEM zu der Gruppe von TNFR-Familienmitgliedern, die in ihrer zytoplasmatischen Domäne keine „Death Domain“ besitzen. Die Untersuchungen zur  $LT\beta R$ -vermittelten Signaltransduktion konzentrierten sich deshalb auf Signaltransduktionswege und -effekte, die unabhängig von dieser Domäne sind.

Mehrere Veröffentlichungen konnten eine Aktivierung von  $NF\kappa B$  nach  $LT\beta R$ -Stimulierung durch löslichen  $LT\alpha_1\beta_2$ -Liganden oder agonistische Antikörper zeigen (Mosialos, 1995; Mackay, 1996). Ursächlich beteiligt an der Signalweiterleitung ist dabei TRAF5 (Nakano, 1996). Im  $LT\beta R$  ist eine ca. 99 Aminosäuren lange, C-terminale Region für die Vermittlung des aktivierenden Signals verantwortlich (Chen, unveröffentlichte Ergebnisse).

Neben TRAF5 ist auch TRAF2 an der  $NF\kappa B$ -Aktivierung beteiligt (Chen, unveröffentlichte Ergebnisse). Außer TRAF5 und TRAF2 interagiert auch TRAF3 mit dem  $LT\beta R$  (Mosialos, 1995; Nakano, 1996). Mit Hilfe dominant-negativer TRAF3-Mutanten wurde nachgewiesen, dass dieses Adaptermolekül für die  $LT\beta R$ -vermittelte Apoptose, nicht jedoch für die  $NF\kappa B$ -Aktivierung notwendig ist (VanArsdale, 1997).

Zur Auslösung der intrazellulären Signaltransduktion wurde für Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie die Rezeptor-Trimerisierung als notwendig postuliert (Banner, 1993). Mit  $LT\alpha_1\beta_2$  als Liganden ist allerdings wegen nur zweier identischer Bindungsgruben eine Trimerisierung des  $LT\beta R$  nicht möglich. Tatsächlich konnte mit Hilfe chimärer Rezeptormoleküle die Dimerisierung als ausreichend für die  $NF\kappa B$ -Aktivierung gezeigt werden (Chen, unveröffentlichte Ergebnisse), was auch durch die Beobachtung der  $LT\beta R$ -Aktivierung durch monoklonale Antikörper gestützt wird. Zusätzlich können sich die

dimerisierten Rezeptoren zu größeren Rezeptorcluster zusammenlagern (Degli-Esposti, 1997).

Seit der Entdeckung des LT $\beta$ R wurde eine ganze Reihe von Arbeiten zu LT $\beta$ R-vermittelten Effekten veröffentlicht, die sich hauptsächlich in zwei Gruppen einteilen lassen: die erste Gruppe beschäftigt sich mit **zytotoxischen Effekten**. Die zweite Gruppe von LT $\beta$ R-vermittelten Effekten umfasst Untersuchungen zur **Rolle des LT $\beta$ R bei der Entstehung von sekundären lymphatischen Organen** während der Embryogenese und deren Strukturerhalt im adulten Organismus. Hieraus ergeben sich möglicherweise funktionelle Parallelen zu chronischen Entzündungen, wie sie bei Multipler Sklerose und Diabetes mellitus Typ1 (IDDM), rheumatoider Arthritis und chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine Rolle spielen.

Zuerst zu den **zytotoxischen Effekten**: Obwohl der LT $\beta$ R keine „Death Domain“ (DD) in seiner zytoplasmatischen Domäne besitzt, konnte unter bestimmten experimentellen Bedingungen *in vitro* eine zytotoxische Wirkung nach LT $\beta$ R-Aktivierung festgestellt werden. Bei gleichzeitiger Gabe von IFN $\gamma$  führte die LT $\beta$ R-Aktivierung durch rekombinanten, löslichen LT $\alpha_1\beta_2$ -Liganden oder immobilisierte monoklonale anti-huLT $\beta$ R-Antikörper zu apoptotischem Tod der humanen Epithelzelllinien HT29 (Browning, 1996). Es ist jedoch anzumerken, dass es sich hier um einen bestimmten Subklon (HT29.14s) handelt. In allen anderen Zelllinien, die in dieser Publikation untersucht wurden, konnte keine durch LT $\beta$ R-Aktivierung vermittelte Apoptose beobachtet werden. Verglichen mit dem schnellen durch Fas-Rezeptor vermittelten Zelltod (12-24h) vollzieht sich LT $\beta$ R-induziertes Absterben wesentlich langsamer (1-2 Tage). Für LIGHT wurden ähnliche Ergebnisse veröffentlicht. Zhai (1998) konnte in Anwesenheit von IFN $\gamma$  ein LIGHT-induziertes, langsames apoptotisches Absterben in MDA-MB-231- (Mamma-Adenokarzinom) und HT-29-Zellen beobachten. Daher könnte man annehmen, dass für LIGHT-induzierte Apoptose sowohl LT $\beta$ R als auch HVEM auf der Zielzelle exprimiert sein muss. Nach dieser Hypothese könnte dem LIGHT-HVEM-Signal eine costimulatorische Rolle zukommen. Eine IFN $\gamma$ -unabhängige, durch lösliches huLIGHT induzierte Wachstumshemmung wurde für A375-Zellen gezeigt (Hehlhans, 2001).

Im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Nutzung der LT $\beta$ R-vermittelten Apoptose wurde von der Gruppe um Yang (Zhai, 1998) in Experimenten mit Nackt-Mäusen gezeigt, dass LIGHT-transfizierte MDA-MB-231-Zellen im Gegensatz zu nicht transfizierten nicht als Tumor wuchsen. Eine Wachstumshemmung nach LT $\beta$ R-Stimulierung durch monoklonale Antikörper wurde auch bei WiDr-Zellen beobachtet, die im SCID-Mausmodell getestet wurden (Browning, 1996). Der Effekt war unabhängig von IFN $\gamma$ , konnte dadurch jedoch verstärkt werden.

Die bisher vorgestellten Arbeiten versuchten stets eine LT $\beta$ R-vermittelte Apoptose oder zumindest eine Wachstumshemmung zu zeigen. Jedoch existieren auch Daten die *in vitro* eine Wachstumsstimulierung zeigen, z.B. an der humanen Fibroblastenzelllinie WI-38 (Browning, 1996). In unserer Arbeitsgruppe wurde im Mausmodell LT $\beta$ R-abhängiges Tumorstadium (BFS-1, Fibrosarkom) nachgewiesen (Hehlhans, 2002), das durch Transfektion der BFS-1 Zellen mit einem löslichen LT $\beta$ R:Ig-Fusionsprotein, zur Blockade der LT $\beta$ R-Aktivierung, hemmbar war. Dies wurde auf eine verminderte Sekretion von MIP-2, homolog zum humanen Angiogenesefaktor IL-8, der transfizierten Tumorzellen zurückgeführt. Auch *in vitro* wurde wie zuvor bei humanen Melanom- und Fibroblastenzelllinien bei den mäuseichen BFS-1 Zellen eine vermehrte MIP-2 Sekretion nach LT $\beta$ R-Aktivierung beobachtet (Degli-Esposti, 1997; Hehlhans, 2002; Hehlhans, 2003)

Die meisten Veröffentlichungen über LT $\beta$ R beschäftigen sich mit der **Rolle des LT $\beta$ R bei der Entstehung von sekundären lymphatischen Organen**. Die Entwicklung und Reifung der sekundären lymphatischen Organe ist in den letzten Jahren intensiv beforscht worden (Übersicht bei Fu und Chaplin, 1999). Hierbei wird den Mitgliedern der TNF-Liganden- und TNF-Rezeptorfamilie eine entscheidende Rolle zugewiesen.

Die ersten Hinweise auf eine Verbindung zwischen LT und der Entstehung sekundärer lymphatischer Organe brachten LT $\alpha$ -Gendeleionsexperimente. LT $\alpha$ -/-Mäuse besitzen trotz funktioneller Lymphbahnen keine peripheren und mesenterialen Lymphknoten und keine Peyer's Patches. Die Milz ist vorhanden, weist jedoch ein stark gestörte Struktur auf: die T-/B-Zell-Segregation ist unvollständig und die marginale Zone um die Lymphfollikel fehlt. Darüber hinaus sind die PNA<sup>+</sup>-B-Zellcluster nicht richtig lokalisiert und das Netzwerk der follikulären dendritischen Zellen (FDC) fehlt vollständig (DeTogni, 1994; Banks, 1995; Matsumoto, 1996). Obwohl LT $\alpha_3$  auch mit den beiden TNFR interagieren kann, machte die Tatsache, dass TNFRII<sup>-/-</sup>-Mäuse keine phänotypischen Auffälligkeiten entwickeln (Erickson, 1994) und die Defekte im lymphatischen System von TNFR I/-Mäusen (keine Peyer's Patches, keine strukturell korrekten Keimzentren) nicht vollständig deckungsgleich sind mit denen von LT $\alpha$ -/-Mäusen (Koni, 1997; Neumann, 1996; Pfeffer, 1993; Rothe, 1993), die Beteiligung des LT $\beta$ R an der Entstehung der sekundären lymphatischen Organe wahrscheinlich. Experimente mit plazentagängigen LT $\beta$ R:Ig-Fusionsprotein, welches schwangeren Mäusen zur Hemmung der LT $\beta$ R-Aktivierung injiziert wurde, bewiesen die Abhängigkeit der Peyer's Patches- und Lymphknoten-Bildung (alle, außer mesenteriale und einige Darm-assoziierte) von der LT $\alpha_1\beta_2$ -induzierten LT $\beta$ R-Aktivierung (Rennert, 1996, 1997). Dieses Ergebnis wurde durch die Deletion des LT $\beta$ R-Gens bestätigt und sogar erweitert (Futterer, 1998): LT $\beta$ R/-Mäusen fehlen alle Lymphknoten. Außerdem haben diese Mäuse auch geringere Mengen an IgA-Antikörpern und  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin positiven Lymphozyten, wodurch dem LT $\beta$ R eine wichtige Rolle im darmspezifischen Immunsystem beigemessen

wird. Auch die Milzstruktur in  $LT\beta R^{-/-}$ -Mäusen ist gestört, was sich in einer gestörten Trennung der T- und B-Zellgebiete zeigt. Zusätzlich wird keine Marginalzone beobachtet.

Für die Anlage von Keimzentren in sekundären lymphatischen Organen spielen follikulär dendritische Zellen (FDC) eine wichtige Rolle. In Versuchen mit  $LT\beta R:Ig$  wurde gezeigt, dass zur Aufrechterhaltung des FDC-Netzwerkes eine stetige  $LT\beta R$ -Aktivierung notwendig ist. Denn schon eine einmalige Gabe von  $100\mu g$   $LT\beta R:Ig$  i.p. verursachte eine signifikante Rückbildung des FDC-Netzwerkes in der Milz. Interessanterweise konnte in Mäusen, deren FDC-Netzwerk durch  $LT\beta R:Ig$  Gabe gestört war, ein signifikant längeres Überleben nach Prionen-Infektion beobachtet werden (Mabbott, 2000; Prinz, 2002).

Ngo (1999) konnte zeigen, dass  $LT\alpha/\beta$  und TNF wichtig für die Regulation der BLC („B lymphocyte chemoattractant“)-, SLC („secondary lymphoid tissue chemokine“)- und ELC (EBV-induced molecule 1 ligand chemokine“-Expression in lymphoiden Gewebe sind. Bereits vorher war die Sekretion von IL-8 und RANTES durch die Melanomlinie A375 und die Fibroblastenlinie WI-38VA13 nach  $LT\beta R$ -Aktivierung berichtet worden (Degli-Esposti, 1997). Eine andere Arbeit (Ansel, 2000) zeigt, dass BLC nach  $LT\beta R$ -Aktivierung von FDC produziert wird und durch positive Rückkopplung bei einer Immunantwort eine rasche Expansion des follikulären Kompartiments ermöglicht. Derselbe Mechanismus wirkt vermutlich auch bei der Organogenese der Lymphknoten und Peyer's Patches, wo B-Zellen aus der Umgebung durch BLC angelockt werden (Luther, 2000).

Wenn man versucht, die Expression einzelner Chemokin- oder Adhäsionsmoleküle bestimmten Ligand-/ Rezeptorinteraktionen zuzuordnen, konnte gezeigt werden, dass  $LT\alpha_3$  die Expression von VCAM-1, ICAM-1 und MAdCAM-1 reguliert, während durch  $LT\alpha_1\beta_2/LT\beta R$  die PNA- bzw. MAdCAM-1-Expression zur Rekrutierung naiver T-Zellen gesteuert wird (Cuff, 1999; Rennert, 1997; Debard, 2001). Während die Expression von SLC und BLC im entzündeten Nierengewebe von  $LT\alpha_3$  abhängig zu sein scheint, wurde in der Milz eine Beteiligung des  $LT\beta R$  gezeigt. In einem anderen Modell wurde die SLC und BLC Expression ebenfalls als abhängig von  $LT\alpha_1\beta_2$  charakterisiert (Ngo, 1999; Hjelmstrom, 2000). Die Regulationsmechanismen der Chemokinexpression scheinen somit stark vom Gewebetyp bestimmt zu werden.

Die angesprochenen Chemokine sind sowohl bei embryonalen Lymphogenese als auch in chronischen Entzündung bzw. Autoimmunerkrankungen beteiligt. Es hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass chronische Entzündungen meist mit der Neubildung von sekundären lymphatischen Strukturen einhergehen (Sacca, 1995; Hjelmstrom, 2000; Cannella, 1990; Faveeuw, 1994). So wurden beispielsweise im Thymus von Myasthenia gravis-Patienten Lymphfollikel und Keimzentren gefunden. Ähnliche Strukturen wurden auch in den Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis beobachtet. Im Typ1 Diabetes-Mausmodell ging der Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas die Ausbildung von Lymphfollikeln voraus. Ähnliche

pathologische Veränderungen lassen sich auch bei Multipler Sklerose und der Hashimoto Thyroiditis beobachten (Wang, 2001; Kratz, 1996). In mehreren Veröffentlichungen wurde ein ursächlicher Zusammenhang zwischen dem LT $\beta$ R-System und der Ausbildung lymphoider Strukturen in Entzündungssituationen gezeigt (Kratz, 1996; Sacca, 1998; Cuff, 1998; Cuff, 1999; Hjelmström, 2000; Hjelmström, 2001).

In zwei Mausmodellen für entzündliche Darmerkrankungen (Colitis Ulcerosa) konnte durch Hemmung des LT $\alpha_1\beta_2$ /LT $\beta$ R-Signaltransduktionspfades eine deutliche Besserung erreicht werden (Mackay, 1998; Dohi, 2001). Diese Wirkung wird hauptsächlich durch die Störung der Lymphknotenarchitektur und damit einer weniger effektiv verlaufenden Immunreaktion erklärt. In einem weiteren Modell experimenteller Colitis wurde LT $\beta$ R-Aktivierung ebenfalls für wichtig befunden (Spahn, 2003), und das fehlende oder zumindest stark reduzierte Krankheitsbild der EAMG (Experimentelle Autoimmun-Myasthenia gravis) in LT $\alpha$ -/- bzw. LT $\beta$ -/- Mäusen deutet in die gleiche Richtung (Goluszko, 2001). Dabei spielt LT $\alpha$  eine wichtigere Rolle als LT $\beta$ , da bei Ausfall dieses Moleküls sowohl der LT $\alpha_3$ /TNFRI- als auch der LT $\alpha_1\beta_2$ /LT $\beta$ R-Signalweg unterbrochen wird und dies zu einer umfassenderen Beeinträchtigung der sekundären lymphatischen Gewebe führt (vgl. oben).

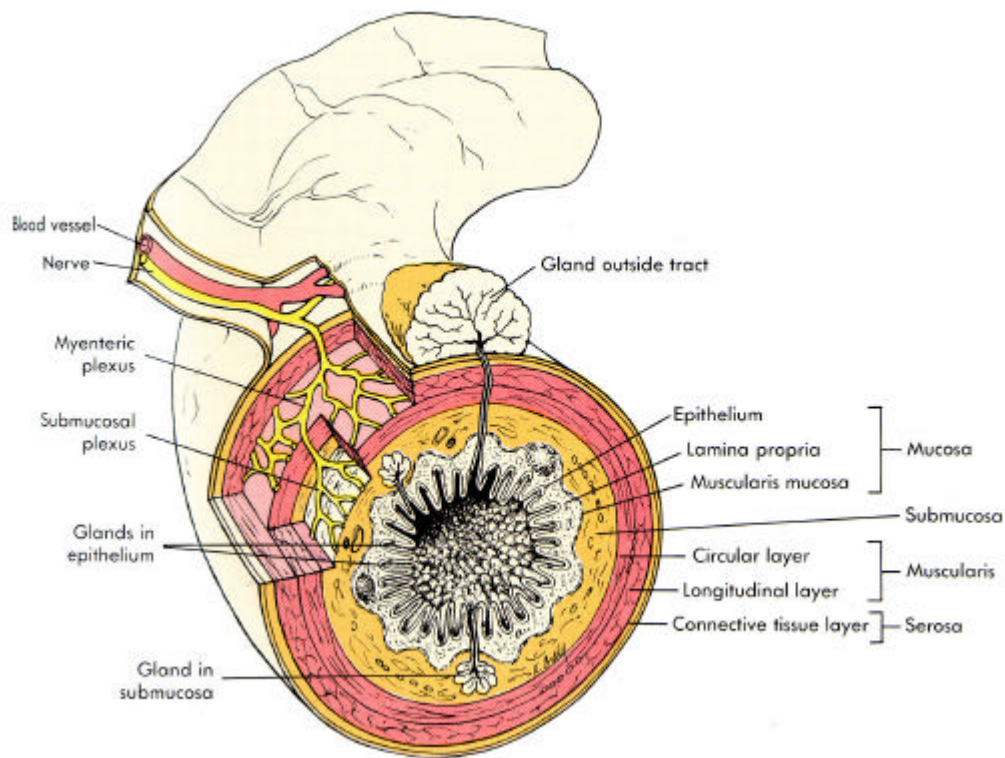
Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit die Rolle der LT $\beta$ R-Aktivierung im Maus-Modell der akuten bzw. chronischen DSS-induzierten Colitis untersucht und mögliche Wirkmechanismen geklärt werden.

## 1.2 Colitis Ulcerosa

Die epithelialen Oberflächen des Körpers, wie die Haut und die Epithelzellen, die die tubulären Strukturen unseres Körpers auskleiden, wie etwa das Gastrointestinal-, das Respiratorische- und das Urogenitalsystem, bilden eine schützende physikalische Barriere gegen die meisten Mikroorganismen. Zu einer Infektion kommt es nur, wenn Krankheitserreger diese Barrieren überqueren oder besiedeln. Es gibt auch chemische Barrieren gegen Infektionen, wie beispielsweise der niedrige pH Wert im Magen, die Verdauungssysteme im oberen Gastrointestinaltrakt und saure, hochmolekulare Glykoproteine (Mucine) im Darm. Mucine werden vorwiegend von den in Krypten lokalisierten Becherzellen gebildet und legen sich als Oberflächenschutz vor der hohen Keimdichte im Darmlumen auf das Epithel. Mit einer Oberfläche von 300-400m<sup>2</sup> stellt der Darm die größte Kontaktfläche des Körpers mit der Außenwelt dar. Im Dickdarm findet man eine Bakteriendichte (überwiegend Anaerobier) von 10<sup>11</sup> Bakterien pro g Darminhalt. Der Darm setzt sich aus 4 Wandschichten zusammen (vgl. Abb. 1-2): der Mukosa, der Submukosa, der Muskularis und der Serosa. Die Mukosa besteht aus einer dem Darmlumen zugewandten Epithelschicht und der darunter liegenden Lamina Propria, die durch die



Basalmembran voneinander getrennt sind. Die Lamina Propria sowie die daran anschließende Submukosa stellen normales Stromagewebe dar, das aus einem vaskularisierten Verband immunkompetenter Zellen wie Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen und Fibroblasten besteht. Beide werden durch die Muskularis mukosa voneinander getrennt. Daran schließt sich die Muskularis an, die aus einem inneren Ring- und einem äußeren Längsmuskel der glatten Muskulatur gebildet wird und für die Mobilität verantwortlich ist. Den Abschluss der Darmwand bildet in den meisten Darmabschnitten die Serosa. (Hollander, 1994; Trier, 1993). Der Darm verfügt über ein äußerst effektiv wirkendes immunologisches Abwehrsystem, das mit ca. 50% der lymphatischen Zellen des ganzen Körpers das größte Immunorgan des Gesamtorganismus repräsentiert.



**Abbildung 1-2: Aufbau der Darmwand (aus Charles Schauf: „Human Physiology“, Times Mirror/Mosby College Publishing, 1990).**

Zwei chronisch entzündliche nicht infektiöse Erkrankungen des Darms besitzen große klinische Bedeutung: Colitis Ulcerosa, die ausschließlich auf den Dickdarm (Colon) und dort meist nur auf die Mukosa beschränkt ist und Morbus Crohn, der ausgehend von Entzündungsprozessen der Lamina propria alle Darmwandschichten befällt und von Mundhöhle bis Darmausgang reichen kann (Braegger, 1994; Brandtzaeg, 2001). Die Etiologie dieser chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist bisher nicht geklärt. Es werden verschiedene Entstehungsgründe diskutiert. Bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der CED scheinen mehrere Faktoren eine Rolle zu spielen. Die jährliche

Neuerkrankungsrate beträgt epidemiologischen Studien zufolge für Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn 2-15 bzw. 1-5 pro 100 000 Einwohner, meist im Alter zwischen 20 und 30 Jahren. Familiäre Untersuchungen lassen auf eine genetische Prädisposition für Morbus Crohn, jedoch weniger für Colitis Ulcerosa schließen. Außerdem werden Umwelteinflüsse, wie z.B. Infektionskrankheiten, Diät, Stress, pathogene Bakterien oder Viren in Betracht gezogen. Es mehren sich aber die Anzeichen, dass die Pathogenese von CED auf eine abnormale und unkontrollierte Immunreaktion gegen eine normalerweise harmlose Darmflora zurückzuführen ist (Wittig, 2001; Shanahan, 2001; Karlinger, 2000). Eine Autoimmunogenese wird vor allem bei der Colitis Ulcerosa durch die Existenz von Autoantikörpern und durch verstärktes Auftreten weiterer Autoimmunerkrankungen diskutiert.

Das intestinale Immunsystem wird durch den kontinuierlichen Kontakt mit intraluminalen Antigenen vor besondere Aufgaben gestellt. Einerseits muss gegen oral aufgenommene Pathogene eine effiziente Immunantwort eingeleitet werden. Andererseits verhindern jedoch immunregulatorische Mechanismen eine überschießende Immunantwort auf harmlose Antigene aus der Nahrung oder der bakteriellen Darmflora. Physiologisch wird somit gegen die meisten Antigene Toleranz induziert (Kelsall, 1999). Diese Vorgänge werden durch Zytokine gesteuert, und als eine mögliche Ursache für CED gilt die gesteigerte mukosale Immunantwort. Dies zeigt sich in einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen zugunsten der proinflammatorischen Zytokine. Diese Vermutung wird durch folgende Daten unterstützt: Es wurden systemisch im Serum oder lokal in der Darmschleimhaut von Patienten mit CED erhöhte Konzentrationen der inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  gefunden. Darüber hinaus wurden gesteigerte Konzentrationen der Chemokine IL-8 und MCP-1 und der Phospholipid-Mediatoren LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> und PAF gemessen (Wittig, 2001; Murata, 1995; Daig, 1996; Baumeister, 1996; Kojouharoff 1997; Obermeier, 1999). Demgegenüber blieben die Mengen an antiinflammatorisch wirkenden Zytokinen wie IL-1RA und IL10 meist unverändert (Casini-Raggi, 1995; Braegger, 1994; Schreiber, 1995). Systemisch erhöhte Zytokinwerte wurden überwiegend bei Morbus Crohn und weniger bei Colitis Ulcerosa Patienten gefunden.

Zur Untersuchung der Pathophysiologie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wurden zahlreiche Colitis-Tiermodelle entwickelt (Übersicht bei Elson, 1995). Tiermodelle können Studien am Menschen ergänzen und erweitern, aber nicht ersetzen. Ein ideales Tiermodell chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sollte die Pathophysiologie der menschlichen Darmentzündung so exakt simulieren, dass experimentelle Daten aus diesem Modell Rückschlüsse auf Mediatoren der Entzündung sowie immunologische und genetische Grundlagen zulassen, sowie die Möglichkeit zur Untersuchung neuer Therapieformen bieten. Da es leider kein ideales Tiermodell gibt muss man immer mit bestimmten Kompromissen auskommen. Ein Modell das den morphologischen Veränderungen, wie sie bei der Colitis

Ulcerosa beim Menschen gefunden werden, jedoch sehr nahe kommt ist das Dextransulfat (DSS)-Modell. Es basiert auf der Gabe von Dextransulfat, einem sulfatiertem Polysaccharid, im Trinkwasser von Mäusen, wobei durch verschieden lange Anwendung eine akute bzw. chronische Form der Colitis induziert werden kann (Okayasu, 1990). Die pathologischen Veränderungen bei der DSS-induzierten akuten Colitis sind auf die Mukosa des Dickdarms und vor allem auf den distalen und mittleren (transversalen) Darmbereich beschränkt. Im proximalen Darmbereich treten so gut wie keine entzündlichen Veränderungen auf. Histologisch zeigen sich Infiltrationen polymorphkerniger Leukozyten, Erosionen, Dysplasien, Verlust von Becherzellen und Krypten, Schädigung von Epithelzellen, Ulcerationen und eine Ausbildung von Lymphfollikeln (Okayasu, 1990). Es wurde gezeigt, dass DSS von Makrophagen phagozytiert wird, und man vermutet, dass eine andauernde Aktivierung der Makrophagen für die Schädigung des Gewebes mitverantwortlich ist. Ebenfalls wurde auch eine Veränderung der intestinalen Mikroflora mit einem Anstieg der Populationen von *Bacteroides distasonis* und *Clostridium* spp. gefunden. (Okayasu 1990). Darüber hinaus wurde in der anfänglichen akuten Phase ein deutlicher Anstieg der Thromboxan (TXB<sub>2</sub>)-Werte im Plasma, die sich im Verlauf der chronischen Colitis normalisierten, gefunden (Murthy, 1991). Eine Behandlung mit Cyclosporin-A-Einläufen erwies sich in der chronischen Phase als wirksamere Therapie als 5-ASA- oder Glucocorticoid-Behandlung (Murthy, 1993). Für die Entwicklung der DSS-induzierten akuten Colitis scheinen T- oder B-Zellen nicht erforderlich zu sein, da auch in SCID Mäusen eine akute Colitis induziert werden konnte (Dieleman, 1994). Es wurde auch eine Konzentrations-, Zeit- und Zelltyp-abhängige Toxizität von DSS gegen intestinale Maus-Epithelzellen und intraepitheliale Maus-Lymphozyten nachgewiesen (Ni, 1996). Eine Langzeitgabe von DSS (1% DSS über 180 Tage) in Hamstern bewirkte Bildung von Adenokarzinomen (Yamada, 1992). Auch in Ratten führte eine Gabe von DSS über mehrere Monate zu gehäuftem Auftreten von intestinalen Tumoren (Tamaru, 1993).

Die Vorteile dieses Colitis-Modells liegen in der einfachen, billigen und kurzen Induzierbarkeit, in der Reproduzierbarkeit und in der Ausbildung ähnlicher Symptome wie bei der Colitis Ulcerosa beim Menschen. Da im DSS-Modell eine akute bzw. chronische Darmentzündung induziert werden kann, eignet es sich auch sehr gut, um Unterschiede der intestinalen Entzündung in verschiedenen Stadien der Entzündung zu untersuchen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der LT $\beta$ R/LT Liganden Systems sowohl in der akuten als auch in der chronischen Form der DSS-induzierten Colitis zu untersuchen. Hierzu wurde ein LT $\beta$ R:Ig-Fusionsprotein benutzt, um die Aktivierung des LT $\beta$ R zu blockieren.

### 1.3 Die Mastzelle

Paul Ehrlich beschrieb 1879 als erster Zellen im humanem Bindegewebe, deren zytoplasmatische Granula sich durch Toluidinblau anfärben ließen, und gab ihnen den Namen „Mastzellen“. Er vermutete diese Zellen könnten eine wichtige Rolle bei der Ernährung des Bindegewebes spielen. Außerdem wollte er mit dieser Namensgebung betonen, dass die starke Granulierung den Eindruck von „gemästeten“ Zellen erweckt (Ehrlich, 1879).

Erst 1977, also fast ein Jahrhundert später, gelang es mit Hilfe von Knochenmarkstransplantationsversuchen an mastzelldefizienten W/W<sup>v</sup>-Mäusen, die Abstammung der Mastzellen von pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks nachzuweisen (Kitamura, 1978). Mastzellvorläufer werden in die Blutbahn entlassen, wandern in verschiedene Gewebe und differenzieren erst dort unter dem Einfluss des Mikromilieus in morphologisch identifizierbare Mastzellen (Kitamura, 1993). Reife Mastzellen findet man in großer Zahl im Bindegewebe angrenzend an Blutgefäße, Lymphgefäße und Nerven. Auch in der Haut, Schleimhaut des Respirations- und Gastrointestinaltrakts und in Lymphgewebe sind Mastzellen vorhanden. Sie sind unter der epithelialen Oberfläche von Organen anzutreffen, welche Umwelteinflüssen besonders stark ausgesetzt sind, wie beispielsweise im Respirations- und Gastrointestinaltrakt. Auch in serösen Überzügen innerer Organe und in Transsudaten, wie der Peritonealflüssigkeit befinden sich physiologischer Weise Mastzellen (Galli, 1990; Galli, 1999). Es wurde auch gezeigt, dass Mastzellen an Orten chronischer Entzündung in enger Nachbarschaft zu T-Zellen zu finden sind (Bhattacharyya, 1998).

In den zytoplasmatischen Granula haben Mastzellen eine Vielzahl von präformierten Mediatoren gespeichert, wie z.B. biogene Amine, neutrale Proteasen, saure Hydrolasen, oxidative Enzyme, Proteoglykane und best. Zytokine (siehe Tabelle 1-2). Daneben können Lipidmediatoren sowie eine Vielzahl von Zytokinen neu synthetisiert werden (Gordon, 1990). Die gespeicherten Mediatoren können nach adäquater Aktivierung durch Degranulation freigesetzt werden, wobei gezeigt werden konnte, dass degranulierte Mastzellen sowohl die Fähigkeit zur Proliferation als auch zur Bildung neuer Granula besitzen (Kuriu, 1989).

Durch die Fähigkeit rasch biologisch aktive Substanzen freizusetzen, sind Mastzellen bei der Pathogenese von Entzündungen und allergischen Reaktionen - vor allem bei Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp - von großer Bedeutung (Scott, 1993; Galli, 1996). Auch bei allergischen Reaktionen von verzögerten Typ (delayed type hypersensitivity = DTH) wird den Mastzellen eine entscheidende Rolle zugesprochen. Hierbei findet eine Reaktion zwischen Mastzellen und T-Zellen statt, deren genauer Mechanismus noch unklar ist. Allerdings gibt es auch eine mastzellunabhängige Form der DTH (Torii, 1993; Torii,

2002). Bei Wurminfektionen und anderen parasitären Erkrankungen wird Mastzellen eine entscheidende Schutzfunktion zugesprochen (Nutman, 1993; Galli, 1998; Galli, 1999). Daneben gibt es eine ganze Reihe pathologischer Prozesse, wie z.B. das Wachstum von Mastzelltumoren, aber auch physiologischer Vorgänge, wie z.B. die Angiogenese oder die Entstehung von Narbengewebe, bei denen Mastzellen eine wichtige Rolle spielen (Rothe, 1990; Norrby, 1993; Galli, 1998; Galli, 1999).

<b>Präformierte Mediatoren</b>	
<b>Biogene Amine</b>	Histamin Serotonin
<b>Neutrale Proteasen</b>	Chymasen Trypsasen Carboxypeptidasen
<b>Saure Hydrolasen</b>	$\beta$ -Hexosaminidase $\beta$ -Glucuronidase $\beta$ -D-Galactosidase
<b>Oxidative Enzyme</b>	Superoxid-Dismutase Peroxidase
<b>Proteoglykane</b>	Heparin Chondroitinsulfat
<b>Zytokine</b>	TNF
<b>Chemotaktische Faktoren</b>	ECF NCA
<b>De novo synthetisierte Mediatoren</b>	
<b>Lipidmediatoren</b>	5-Lipoxygenase Produkte: 5-HPETE Leukotriene Cyclooxygenaseprodukte: Prostaglandine Thromboxan Thrombozyten aktivierender Faktor
<b>Zytokine</b>	Nach Aktivierung exprimiert: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, TNF, IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2, GM-CSF

**Tabelle1-2: Mastzellmediatoren**

Eine große Anzahl immunologischer und nicht immunologischer Stimuli können die Freisetzung von Mastzellmediatoren bewirken. Die klassische Aktivierung der Mastzelle erfolgt über eine Quervernetzung des hochaffinen mit Immunglobulin-E besetzten Rezeptors (Fc $\epsilon$ RI) auf der Zelloberfläche durch ein multivalentes Antigen, was zu den drei nachfolgenden Antworten führt (Hohman, 1993; Plaut, 1989):

- Exozytose der Granula und damit Freisetzung der präformierten Mediatoren
- Synthese und Freisetzung von Lipidmediatoren
- Bildung und Sekretion von Zytokinen

Die ersten zwei genannten Ereignisse vollziehen sich innerhalb von Sekunden bis zu wenigen Minuten nach der Stimulierung. Die Neubildung und Sekretion der meisten Mastzell-Zytokinen hingegen benötigt mehrere Stunden.

Neben der FcεRI Quervernetzung gibt es noch eine Reihe weiterer Induktoren, die eine sehr starke Degranulation der Mastzellen bewirken können (Tabelle 1-3). Auch die Freisetzung von TNF von Mastzellen wurde beobachtet, wenn Mastzellen in Kokultur mit aktivierten T-Zellen gehalten wurden (Bhattacharyya, 1998).

Rezeptoren	CD117, IL3R, IL4-R, FcεRI, FCγRIII
Anaphylotaxine	C3a, C4a, C5a
Neuropeptide	Substanz P, Neurotensin
Zytokine	IL-1, IL-3, IL-10, GM-CSF, KL
Medikamente	Muskelrelaxantien, Antibiotika, Opioide
Ca-Ionophore	A23187, Ionomycin
Physikalische Stimuli	Hitze, Kälte, Druck
Histaminfreisetzende Faktoren aus	neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten, Thrombozyten, Makrophagen, Endothelzellen
Hypoxie	

**Tabelle 1-3:**

**Immunologische und nicht immunologische Stimuli, die auf Mastzellen aktivierend wirken** (modifiziert nach Hohman, 1993)

Letztlich führen diese Stimulierungen alle zur Freisetzung von intrazellulär gebundenem Kalzium und zum erhöhten Influx von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  in die Mastzelle. Eine Stimulierung über den IgE-Rezeptor führt außerdem zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), der Phospholipasen A2, C und D, sowie der Adenylatzyklase, welche cAMP als second messenger entstehen lässt (Razin, 1995; Hamawy, 1995; Ravetch, 2001).

Erste Hinweise auf morphologische Unterschiede von Mastzellen in Abhängigkeit ihrer Verteilung in verschiedenen Geweben liegen seit 1906 vor (Maximow, 1906). Doch erst mit detaillierten Untersuchungen der Fixierungs- und Färbemethoden von Mastzellen wurde die heute gebräuchliche Unterteilung der Mastzellen im murinen System möglich. Es handelt sich hierbei einerseits um die atypischen oder mukosalen Mastzellen (MMC= mucosal mast cells) der intestinalen Lamina Propria und andererseits um die Bindegewebsmastzellen (CTMC= connective tissue mast cells), die vorwiegend in der Haut und in der Peritonealflüssigkeit zu finden sind.

Mehreren Arbeitsgruppen gelang es 1981, nahezu reine Mastzellpopulationen durch Kultur normaler muriner Knochenmarkzellen mit Kulturüberständen von Concanavalin A-stimulierten T-Zellen *in vitro* herzustellen (Nabel, 1981; Nagao, 1981; Razin, 1981). Diese Mastzellen (BMMC= bone marrow-derived mast cells) werden als relativ unreife Zellen angesehen (Galli, 1982). Sie ähneln phänotypisch MMC verändern jedoch nach Cokultur mit Maus 3T3 Fibroblasten ihren Phänotyp und gleichen dann eher CTMC. Der entscheidende Faktor, welcher in konditionierten Medien die Mastzellen zur Differenzierung und Proliferation anregt, ist das IL-3 (Fung, 1984). Solche, mittels konditionierter Medien bzw. rekombinanten IL-3, aus Knochenmark gezüchteten Zellpopulationen bezeichnet man als primäre Mastzellkulturen. Neben IL-3 sind noch andere Zytokine beschrieben worden, die Mastzellen zur Proliferation und auch zur Differenzierung zu dem einen oder anderen Phänotyp anregen, nämlich: IL-4, IL-9, IL-10, SCF.

Die Abhängigkeit des Mastzell-Phänotyps von der anatomischen Lokalisation wurde 1985 gezeigt (Nakano, 1985). Außer den Unterschieden in morphologischer Hinsicht und der unterschiedlichen Verteilung im Körper gibt es auch Hinweise auf eine Heterogenität in der Zytokinexpression der beiden phänotypischen Erscheinungsbilder der Mastzellen.

Alles bisher geschriebene bezieht sich auf Mastzellen von Nagern. Die meisten Erkenntnisse über humane Mastzellen wurden an *ex vivo* gewonnenen Zellen aus der Lunge, der Bronchiallavage, der Haut und der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes gewonnen. Daneben gibt es seit 1988 eine einzige menschliche Mastzelllinie, welche aus dem peripheren Blut eines Patienten mit einer Mastzelleukämie etabliert wurde (Butterfield 1988). Ein mit dem Maussystem vergleichsweise einfaches Kulturverfahren für *in vitro* Experimente an humanen Mastzellen steht nicht zur Verfügung. Es bereitet nach wie vor Schwierigkeiten, Mastzellen in ausreichender Menge und Reinheit aus menschlichem Knochenmark oder fetalem Blut zu generieren.

Darüber hinaus gibt es auch erste Hinweise für Mastzellheterogenität beim Menschen basierend auf deren Zytokingehalt (Bradding, 1995). Die anatomische Lokalisation der humanen Mastzellen korreliert im Gegensatz zu derjenigen der Nager nicht eindeutig mit dem Phänotyp.

Wegen der oben beschriebenen räumlich nahen Lokalisierung von Mastzellen zu T-Zellen bei Entzündungsreaktionen und weil aktivierte T-Zellen sowohl  $LT\alpha_1\beta_2$  als auch LIGHT exprimieren und Mastzellen nach Zell-Zell-Kontakt mit aktivierten T-Zellen degranulieren, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob BMMC  $LT\beta R$  exprimieren. Weiterhin sollte gezeigt werden, ob das  $LT\beta R$ -LT Liganden System eine mögliche Form der Kommunikation zwischen aktivierten T-Zellen und Mastzellen darstellt.

## 1.4 Ziel der Arbeit

In den letzten Jahren zeigten die Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen, dass LT $\beta$ R-Aktivierung bei der Ausbildung und Manifestation von entzündlichen Darmerkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Die Wirkmechanismen, die dabei eine Rolle spielen, sind aber noch nicht völlig aufgeklärt. Daher war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, die Rolle der LT $\beta$ R-Aktivierung in der akuten und in der chronischen Form der DSS-induzierten Colitis zu charakterisieren und mögliche Wirkmechanismen aufzuzeigen.

Aktivierte T-Zellen exprimieren die Liganden LT $\alpha_1\beta_2$  und LIGHT des LT $\beta$ R und sind bei Entzündungsreaktionen dicht neben Mastzellen lokalisiert gefunden worden. Die Mechanismen, die bei der Übertragung von Signalen von aktivierten T-Zellen auf Mastzellen eine Rolle spielen, sind jedoch nur in geringem Maße erforscht. Daher sollte als zweites Ziel dieser Arbeit die Möglichkeit einer LT $\beta$ R-Expression auf Mastzellen untersucht werden. Darüber hinaus wurde geprüft, ob dies einen möglichen Kommunikationsmechanismus zwischen T-Zellen und Mastzellen darstellen könnte.



## **2. Material**

### **2.1 Chemikalien und Reagenzien**

2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure(6)) (ABTS)	Boehringer Mannheim
ABTS Substrat Puffer	Boehringer Mannheim
Agarose, electrophoresis grade	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid-Bisacrylamid Lösung	Roth, Karlsruhe
Bovine Serum Albumine (BSA)	Boehringer, Mannheim
Biotinyl- $\epsilon$ -Aminocaprinsäure-N-Hydroxysuccinimidester	Sigma Aldrich, Steinheim
Chloroform	Fluka, Buchs, Schweiz
Coomassie Brilliant Blue R 250	Fluka, Buchs, Schweiz
Dextransulfat (DSS, MG: 36000-50000)	ICN Biochemicals, Ohio, USA
Desoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Fluorescein Isothiocyanate (FITC)	Sigma Aldrich, Steinheim
G418 (Geneticin)	PAN Biotech, Aidenbach
Gentamycin	ICN, Meckenheim
Giemsa-Staining Modified	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
IMDM Medium	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
Ionomycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Hybridisierungslösung – ULTRAhyb	Ambion, Huntington, UK
May-Grünwald-Staining Modified	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
N,N-Dimethylformamid	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ni-NTA-Harz	Qiagen, Hilden
PCR-Puffer, 10x conc.	Roche Diagnostics, Mannheim
P-Nitrophenyl-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosamin	Sigma Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Phorbol myristate acetate (PMA)	Sigma Aldrich, Steinheim
RNA Later	Ambion, Huntington, UK
RPMI 1640-Pulvermedium	Sigma Aldrich, Steinheim
SIGMA 104	Sigma Aldrich, Steinheim
TEMED	Sigma Aldrich, Steinheim

## Material

---

TRIzol Reagenz	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA-Lösung	Tecnomara, Fernwald
Tween 20	Fluka, Buchs, Schweiz
Tyrodé's Puffer	Sigma Aldrich, Steinheim

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen und hatten den Reinheitsgrad p.a..

## 2.2 Verbrauchsmaterial und Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent, Waldbronn
Agilent Bioanalyzer RNA-Chip	Agilent, Waldbronn
Begasungsbrutschrank – Cell Safe	Integra Biosciences, Baar, Schweiz
Eppendorfcups (1,5 ml / 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Plastik-Pistille	Eppendorf, Hamburg
ELISA Reader	MWG Biotech, Ebersberg
FACS Röhrchen	Labor Schubert, Schwandorf
FACScan Flow Cytometer	Becton-Dickinson, Heidelberg
Gelelektrophoreseapparaturen	BioRad, München
Gewebekulturschalen	Becton-Dickinson, Heidelberg
Hyperfilm ECL	Amersham, Braunschweig
Inkubatoren	Heraeus, Hanau
Kryo-Röhrchen	Nunc, Naperville
Kryostat - Schneidemaschine	Reichert Jung, Nussloch
Laminair Flow HB 2448– Sterilbank	Heraeus, Hanau
Light Cycler	Roche, Mannheim
Mikroskop	Olympus, Hamburg
Mikrospin S – 200HR Säulen	Amersham, Braunschweig
Mikrotiterplatten	Falcon, Heidelberg
Neubauer Zählkammer	Brand, Giessen
Nitrocellulosemembran	Osmonics, Minnetonka, USA
Nylon Transfer Membran	Pall GmbH, Dreieich
PCR-Thermocycler	Perkin Elmer, Shelton, USA
Polystyrolröhrchen	Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg

## Material

---

Röntgenfilm Biomax	Kodak, Rochester
Spannungsgerät: Biorad 200/2,0 Constant Voltage	BioRad, München
S-VHS Video Recorder (AG7355)	Panasonic, Osaka, Japan
Ultra Turrax	IKA Labortechnik, Staufen
UV-Schirm (254 nm und 366 nm)	Bachhofer, Reutlingen
Video Kamera HG 16 PCO	PCO, Kehlheim
Waagen: Sartorius R16OP	Sartorius, Göttingen
Sartorius L2200S	Sartorius, Göttingen
Whatman Filterpapier	Laborcenter, Nürnberg
Zeiss Mikroskop	Leitz, Wetzlar
Zellkulturflaschen (70, 250, 750 ml)	Falcon Heidelberg
Zentrifugen: Beckmann J2-21 M/E Zentrifuge	Beckmann, München
Beckmann L-70 Ultrazentrifuge	Beckmann, München
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Zytospin Zentrifuge	Shandon, Pittsburgh, USA
Zentrifugenröhrchen (15, 50ml)	Falcon, Heidelberg
Zellsiebe – Cellstrainer	Falcon, Heidelberg

## 2.3 Kits

DAB-Substrat kit	Becton-Dickinson, Heidelberg
DC Protein Assay	BioRad, München
ECL- Western Blot Detection Kit	Energene, Regensburg
ELISAs: IL-4	R&D Systems, Wiesbaden
IL-6	R&D Systems, Wiesbaden
MIP-2	R&D Systems, Wiesbaden
RANTES	R&D Systems, Wiesbaden
TNF	R&D Systems, Wiesbaden
Mycoplasma detection kit	Roche Diagnostics, Mannheim
QIAshredder	Qiagen, Hilden
Prime it II Random Labeling kit	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
Vector AP Substrate Kit III	Vector/Alexis, Grünberg

## 2.4 Molekulargewichtsstandards

DNA-Längenstandards (II, III, X, XIV)

Roche Diagnostics, Mannheim

SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Broad Range

BioRad, München

Proteinmolekulargewichtsstandards

## 2.5 Antikörper und Enzyme

### Antikörper:

FACS: Anti-CD3-PE

Becton-Dickinson, Heidelberg

Anti-CD4-PE

Becton-Dickinson, Heidelberg

Anti-CD8-PE

Becton-Dickinson, Heidelberg

Anti-B220-PE

Becton-Dickinson, Heidelberg

Anti-CD117-PE

Becton-Dickinson, Heidelberg

Anti- $\alpha_4\beta_7$ -Integrin-PE

Becton-Dickinson, Heidelberg

Anti- $\beta_7$ -Integrin-PE

Becton-Dickinson, Heidelberg

Anti- $\alpha_E$ -Integrin-FITC

Becton-Dickinson, Heidelberg

Anti-L-Selectin –PE

Becton-Dickinson, Heidelberg

5G11b-FITC

vgl. 3.3.8

LT $\beta$ R:Ig-FITC

vgl. 3.3.8

5G11b (Ratte-anti-Maus LT $\beta$ R, IgG<sub>2a</sub>)

Helgans, 2003

IC5 (Ratte-anti-Maus LT $\beta$ R, IgG<sub>2a</sub>)

Helgans, 2003

Anti-Maus-FDC-M1 (anti CD21/CD35)

Becton Dickinson, Heidelberg

Anti-Maus-IFN $\gamma$  (Ratten IgG<sub>2a</sub> – Klon RA-6A2)

Kojouharoff, 1997

Anti-Maus-MadCAM-1 (Ratten IgG<sub>2a</sub>)

Becton-Dickinson, Heidelberg

Anti-Maus-PNAd (Ratten IgM)

Becton-Dickinson, Heidelberg

Anti-Maus-TNF (V1q , Ratten IgD)

Echtenacher, 1990

Anti-Ratten-IgG-POX

Sigma Aldrich, Steinheim

Anti-Ratten-IgM biotinyliert

Becton-Dickinson, Heidelberg

humanes IgG<sub>1</sub>

Sigma Aldrich, Steinheim

PNA biotinyliert

Vector/Alexis, Grünberg

Ratten IgM monoclonal isotype standard

Becton-Dickinson, Heidelberg

Ratten IgG<sub>2a</sub> monoclonal isotype standard

Becton-Dickinson, Heidelberg

Ratten IgG<sub>2a</sub> –FITC monoclonal isotype standard

Dako, Hamburg

Streptavidin-AP

Dianova, Hamburg

Streptavidin-POX

Dianova, Hamburg

**Enzyme:**

Taq-DNA-Polymerase

Roche Diagnostics, Mannheim

**2.6 Oligonukleotide**

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma metabion (Martinsried) synthetisiert. Alle Sense-Primer für PCR tragen den Zusatz 5', alle Antisense-Primer tragen den Zusatz 3'.

Oligonukleotid	Sequenz
5'mLTβR extraz. Domäne	5'-GCC GAA GCT TCT GGT GGC CTC TCA GCC CCA G-3'
3'mLTβR extraz. Domäne	5'-GCC GGG ATC CGC TCC TGG CTC TGG GGG ATT-3'
5'mLTα	5'-GAA GGG GTA TTG GGA AAA GAG CTG-3'
3'mLTα	5'-CTC TAG GGG CCC AGG GAC TCT CTG G-3'
5'm LTβ	5'-CCT GCT GGC TGT GGC AGG AGC TAC-3'
3'mLTβ	5'-GTA CCA TAA CGA CCC GTA CCC GAT G-3'
5'mLIGHT	5'-GAG AGT GTG GTA CAG CCT TCA GTG-3'
3'mLIGHT	5'-TGT AAG ATG TGC TGC TGG GTT G-3
5'β-Aktin	5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT-3'
3'β-Aktin	5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC-3'
5'mTNF	5'-GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C-3'
3'mTNF	5'-ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G-3'
5'm IL-6	5'-TGG AGT CAC AGA AGG AGT GGC TAA G-3'
3'm IL-6	5'-TCT GAC CAC AGT GAG GAA TGT CCA C-3'
5'm IL-1β	5'-TGA AGG GCT GCT TCC AAA CCT TTG ACC-3'
3'mIL-1β	5'-TGT CCA TTG AGG TGG AGA GCT TTC AGC-3'
5' 18s RNA	5'-TCA AGA ACG AAA GTC GGA-3'
3' 18sRNA	5'-GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA-3'

## 2.7 Puffer und Lösungen

Beschichtungspuffer für ELISA	50mM NaHCO <sub>3</sub> pH 9.2
Bindungspuffer nativ für Proteinreinigung	500mM NaCl 20mM Na-Phosphat pH 7,8
Blockierlösung für ELISA	10% Magermilchpulver in PBS
Coomassie-Blau-Lösung	0,25% Coomassie blue R250 in 45% Methanol 10% Essigsäure 45 % H <sub>2</sub> O
Coomassie-Entfärbelösung	40% Methanol 10% Essigsäure 50% H <sub>2</sub> O
Denaturierungspuffer für Southern Blot	1,5M NaCl 0,5M NaOH
Ethidiumbromid-Stammlösung	10mg/ml Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O
FITC-Dialyse-Puffer	0,1M Tris HCL 0,2M NaCl (pH 7,4)
FITC-Labeling-Puffer	0,05M Borsäure 0,2M NaCl (pH 9,2)
FITC-Stock-Lösung	5mg/ml FITC in DMSO
β-Hexosaminidase Enzym Substrat Lösung	1mM p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glucosamin in 0,1 M Natrium Citrat Lsg. (pH 4,5)
Imidazol-Elutionspuffer	500 mM Imidazol in Waschpuffer nativ pH 6,0 für Proteinreinigung
Laemmli-Elektrodenpuffer (5x)	40mM Tris Base 0,95M Glycin
Neutralisierungspuffer für Southern Blot	1,5M NaCl 0,5M Tris-HCl (pH8,0)

## Material

---

PBS	150mM NaCl 8mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,3)
0,1% PBS-T	0,1% (v/v) Tween20 in PBS
Sammelgel-Trispuffer	0,5M Tris-HCl (pH6.8)
SDS-Probenpuffer (2x)	20% Glycerin 1,25M TrisHCl (pH 6,8) 4% SDS 0,02% Bromphenolblau 10% β-Mercaptoethanol
SSC (20x)	3M NaCl 0,3M Natriumcitrat (pH 7,2)
Substratlösung für ELISA (AP)	0,06% (w/v) SIGMA104 in Substratpuffer
Substratpuffer für ELISA (AP)	9,8% (v/v) Diethanolamin 24mM MgCl <sub>2</sub> pH 9.8
TAE-Puffer	40mM Tris-HCl 1mM EDTA (pH 8,3)
TBE-Puffer	89mM Tris-HCl 89mM H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub> 2mM EDTA (pH 8,0)
Transferpuffer A – Western Blot	0,3 M Tris Base in 20% Methanol 80% dem. Wasser (pH 10,4)
Transferpuffer B – Western Blot	25 mM Tris Base in 20% Methanol 80% dem. Wasser (pH 10,4)
Transferpuffer C – Western Blot	4mM ε-Amino-n-Caprinsäure in 20% Methanol 80% dem. Wasser (pH 7,6)
Trenngel-Trispuffer	1,5M Tris-HCl (pH 8,8)
0,5% Triton X-100 Lösung	0,5% Triton X-100 in dem. Wasser

Trypanblau-Lösung	0,15% Trypanblau 150mM NaCl
Waschpuffer nativ für Proteinreinigung	500mM NaCl 20mM Na-Phosphat pH 6,0

## 2.8 Zelllinien

BFS1	Maus–Fibrosarkomlinie (Hehlgans,2002)
<b>EL4 5D3</b>	<b>Maus–T-Zell-Zelllinie (Hofmeister, 1997)</b>
ESB	Maus–T-Zell-Zelllinie
L138.8A	Maus–Mastzell-Zelllinie (Hültner, 1990)
PMMI	Maus-T-Zell-Zelllinie (Force, 1995)
X63Ag8-653	Maus-Myelomzelllinie (Herr Dr. L. Hültner (GSF,München))

## 2.9 Zytokine

Maus-IL-3	Als Quelle diente Zellkulturüberstand der mit dem IL-3-Gen transfizierten murinen Myelomzelllinie X63Ag8-653, welche ursprünglich am Institut für Immunologie in Basel etabliert und mir freundlicherweise von Herrn Dr. Lothar Hültner (GSF, München) zur Verfügung gestellt wurde. Zellkultur: $5 \times 10^6$ Zellen/ml in RPMI-1640, 10% FCS, 2mM L-Glutamin, $10^{-5}$ M $\beta$ -Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 1mg/ml G418. Der Einsatz von 1% dieses Zellüberstandes entsprach 20 U/ml IL-3 und somit der proliferativen Aktivität, die von heranwachsenden BMMC benötigt wurde.
SCF	In E.-coli exprimierter stem cell factor (SCF, oder Kit-Ligand) wurde am Institut für Experimentelle Hämatologie des GSF Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit GmbH, München von Herrn Dr. Lothar Hültner hergestellt und mir freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

## 2.10 Tiere

BALB/c	Charles River, Sulzfeld
C57BL/6 Wild Typ	Charles River, Sulzfeld
C57BL/6 LT $\beta$ R -/-	Prof. Dr. K. Pfeffer, Institut für Med.- Mikrobiologie/Hygiene und Immunologie, TU-München



## **3. Methoden**

### **3.1 Arbeiten mit RNA**

Um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurden sämtliche Arbeiten mit RNA mit Handschuhen durchgeführt. Es wurden nur sterile Glaswaren und Plastikreaktionsgefäße sowie autoklavierte Lösungen verwendet. Wasser wurde mit 0,1% Diethylcarbonat versetzt, kräftig geschüttelt, über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag vier Stunden bei 121 °C autoklaviert (DEPC Wasser).

#### **3.1.1 Isolierung von total RNA aus Zellen**

Zur Isolierung von total-RNA wurde TRIzol-Reagenz verwendet. Dazu wurden ca.  $5 \times 10^6$  Zellen ohne weitere Vorbehandlung in TRIzol aufgenommen und die RNA nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet, wobei die Ausbeute etwa 500-1000 µg betrug. RNA wurde nach der Präzipitation mit Isopropanol bei -80°C gelagert. RNA, die sofort weiter verwendet werden sollte, wurde nach dem Präzipitationsschritt mit Isopropanol durch Zugabe von Ethanol (75% V/V) gewaschen, an der Luft getrocknet und in RNase-freiem Wasser aufgenommen. Konzentration und Reinheit der RNA wurde mittels Agilent Bioanalyzer RNA-Chips auf einem Agilent 2100 Bioanalyzer, nach Angaben des Herstellers, bestimmt. Hierbei wird RNA auf einem Gel, das sich auf einem Agilent Bioanalyzer RNA-Chip befindet, in die charakteristischen 18s und 28 s Banden aufgetrennt. Anhand der Bandenstruktur kann durch einen internen Standard die Reinheit und Konzentration der eingesetzten RNA errechnet werden.

#### **3.1.2 Isolierung von total RNA aus Darmgewebe**

Es wurde aus dem distalen Teil des Dickdarms ein etwa 1 cm langes Gewebestück entnommen und bis zur RNA-Isolation in RNA-Later Lösung bei -80° aufbewahrt. Zur Isolation von total-RNA aus Maus-Dickdarm wurde Qiashredder und nachfolgend RNeasy Mini Kit, nach Angaben des Herstellers, verwendet. Zuerst wurde der Maus-Dickdarm mittels Eppendorf-Pistillen in Eppendorf-Cups mechanisch zerkleinert. Da der Dickdarm nicht vollständig zerkleinert werden konnte, mussten verbleibende Dickdarmstücke durch QIAshredder-Filter zentrifugiert werden, um so von der resultierenden Lösung abgetrennt werden zu können. Aus der erhaltenen Lösung wurde RNA mittels RNeasy Mini Kit isoliert und in RNase freiem Wasser bei -80°C eingefroren. Konzentration und Reinheit der RNA wurden wie in 3.1.1 beschrieben mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer ermittelt.

### 3.1.3 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase; RTase) verwendet. Sie synthetisiert DNA-Kopien eines RNA-Moleküls (=complementary DNA; cDNA). Für die Synthese von cDNA-Molekülen, die komplementär zu mRNA-Molekülen sind, wurden Oligo(dT)-Primer verwendet. Sie hybridisieren mit dem poly-A-Ende der mRNA und dienen so für die RTase als Startbereich.

Für die reverse Transkription wurden pro Ansatz 1µg gereinigte mRNA eingesetzt. Diese wurde zu einem Endvolumen von 19,5µl mit RNase freiem Wasser verdünnt und im folgenden Reaktionsansatz (Reverse Transcription Set, Promega) eingesetzt:

Zusammensetzung des kompletten Reaktionsansatzes (pro Probe):

MgCl <sub>2</sub>	8 µl
10x Puffer	4 µl
dNTPs	4 µl
Oligo (dT)-Primer	2 µl
RNase Inhibitor	1 µl
Reverse Transkriptase	1,5 µl
	20,5 µl
+RNA in RNase freiem Wasser	19,5µl
	40 µl

Der Ansatz wurde 15 min bei 42°C, 5 min bei 99°C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Zur Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente durch PCR wurden 5µl der erhaltenen cDNA-Lösung eingesetzt.

## 3.2 Arbeiten mit DNA

### 3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die spezifische Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolge mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50µl durchgeführt.

cDNA	5 µl
PCR Puffer, 10x conc. (Roche)	5 µl
5'Primer	0,2 µl
3'Primer	0,2 µl
Desoxynucleotidmischung (Roche)	4 µl
Tag DNA Polymerase (Roche)	1 µl
Wasser	34,6 µl
	50 µl

Nach einem Denaturierungsschritt von 5 min bei 95°C wurden üblicherweise 35 Zyklen des nachfolgenden Reaktions-Schemas angewandt:

Denaturierung:	95°C; 30sek
Primerannealing:	siehe Tabelle 3-1
Elongation:	72°C; 30 sek

Nach einer abschließenden Elongation für 7 min wurden die amplifizierten PCR-Fragmente auf einem Agarosegel analysiert.

Oligonukleotid	Annealing-Temperatur
mLTBR extraz. Domäne	60°C
mLT $\alpha$	60°C
mLT $\beta$	60,5°C
mLIGHT	60°C
$\beta$ -Aktin	58,5°C

**Tabelle 3-1: Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer.**

### 3.2.2 Agarose Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge erfolgte in Agarosegelen, wobei die Agarosekonzentration 1,5% (w/v) betrug. Dazu wurde Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromidstammlösung im Verhältnis 1:10<sup>4</sup> versetzt und in die Gelapparatur gegossen. Nach dem Abkühlen wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit Laufpuffer im Verhältnis 1:5 vermischt, in die vorbereiteten Geltaschen pipettiert und durch Anlegen einer elektrischen Spannung (5-10V/cm) aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragment-Länge wurden zusätzlich entsprechende DNA-Standards (DNA-Molekulargewichtsstandard II, III, X, XIV) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente auf einem UV-Schirm bei einer Anregungswellenlänge von 254nm sichtbar gemacht und photographiert.

### 3.2.3 Quantitative RT-PCR mittels Light Cycler

Zur Quantifizierung von mRNA aus Dickdarmgewebe wurde wie folgt vorgegangen: RNA wurde wie in 3.1.2 beschrieben aus Dickdarmgewebe isoliert, wie in 3.2.1 in cDNA umgeschrieben und mittels der Light Cycler Technik, nach Angaben des Herstellers, quantifiziert. Hierzu wurden für jede Probe folgender Ansatz hergestellt:

cDNA	2 $\mu$ l
5'Primer	2 $\mu$ l
3'Primer	2 $\mu$ l
Mastermix (Roche)	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1,6-3,2 $\mu$ l
Rest RNase freies Wasser	
	20 $\mu$ l

Hierbei wurde von den ursprünglichen Primer-Lösungen eine 1:20 Verdünnung eingesetzt. Beim Umgang mit dem Mastermix musste auf Lichtschutz geachtet werden.

Der Versuchsansatz wurde dann in das Light Cycler Gerät gegeben und durch folgende Zyklenabfolge (45x) amplifiziert:

Denaturierung:	95°C; 5 sek
Primerannealing:	siehe Tabelle 3-2; 5 sek
Elongation:	72°C; 25 sek

Die Auswertung erfolgte am speziellen Light Cycler Programm.

Oligonukleotid	Annealing-Temperatur	MgCl <sub>2</sub> -Konzentration
mTNF	62°C	4mM
mIL-6	62°C	4mM
mIL-1 $\beta$	60°C	4mM

**Tabelle 3-2:**

Annealing-Temperaturen und zugehörige MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen der verwendeten Primer.

### 3.2.4 Southern Blot

Die in Agarosegelen aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran übertragen (Southern, 1975). Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese für 30 min in Denaturierungspuffer und anschließend zweimal für je 10 bis 15 min in Neutralisierungspuffer leicht geschüttelt. Anschließend wurde das Gel auf Whatmanpapier, das mit 20x SSC getränkt war, gelegt und mit einer Nylonmembran passender Größe bedeckt. Die Membran wurde wiederum mit in 20x SSC getränktem Whatmanpapier und einem hohen Stapel Fließpapier bedeckt. Der gesamte Aufbau wurde mit einem geeigneten Gewicht beschwert. 20x SSC-Lösung diente als Transfer-Puffer und vermittelte die Übertragung der DNA auf die Membran. Nach ca. 24h wurde die DNA auf der Nylonmembran durch UV-Crosslinken immobilisiert.

Die radioaktive Markierung einer doppelsträngigen DNA-Sonde mit <sup>32</sup>P erfolgte unter Verwendung des Prime It II Random Primer Labeling Kit. Dazu wurden 50 bis 100ng DNA mit 10 $\mu$ l Hexanukleotidlösung (5x) in einem Volumen von 24 $\mu$ l für 5 min bei 95°C denaturiert und dann auf Eis gestellt. Nach Zugabe von Reaktionspuffer (5x), der die Nukleotide dATP, dTTP und dGTP enthielt, wurden 5 $\mu$ l <sup>32</sup>P dCTP sowie 1 $\mu$ l Klenow-Fragment zugegeben und der Ansatz bei 37°C ca. 30 bis 60 min inkubiert. Abschließend wurden die nicht eingebauten Nukleotide durch MicroSpin S-200 HR Säulen nach Herstellerangaben entfernt und die so präparierte DNA-Sonde mit einem Szintillationszähler auf ihre spezifische Aktivität überprüft. Die Nylonmembranen mit den immobilisierten DNA-Fragmenten wurden ca. 2h bei 42°C in 10 bis 15ml Hybridisierungslösung prähybridisiert. Anschließend wurde eine radioaktiv markierte Sonde dazu pipettiert und über Nacht bei 42°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung entfernt und die Membran zweimal 10 min mit einer Lösung aus 2x SSC; 0,1% SDS und anschließend zweimal 10 min mit einer Lösung mit 0,2x SSC; 0,1% SDS bei 42°C gewaschen. Schließlich wurde die spezifisch gebundene Sonde autoradiographisch detektiert. Dazu wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und nach 12 bis 24h entwickelt.

### 3.3 Proteinchemische Methoden

#### 3.3.1 Das LT $\beta$ R:Ig-Fusionsprotein

Um die Aktivierung des LT $\beta$ R zu hemmen wurde ein LT $\beta$ R:Ig-Fusionsprotein benutzt. Dies besteht aus der Extrazellulärdomäne des mäuseichen LT $\beta$ R und dem Fc-Teil eines humanen IgG<sub>1</sub>. Da LT $\beta$ R ein Typ I Membranprotein ist, befindet sich der N-Terminus bei der Extrazellulärdomäne und der C-Terminus bei der Intrazellulärdomäne.



Der sogenannte His-Tag besteht aus sechs aufeinander folgenden Histidin-Resten. LT $\beta$ R:Ig bindet, auf Grund seiner doppelt vorhandenen LT $\beta$ R Extrazellulärdomäne, an die Liganden LT $\alpha_1\beta_2$  und LIGHT.

#### 3.3.2 Reinigung von LT $\beta$ R:Ig-Fusionsprotein aus Zellkulturüberstand

Rekombinant exprimierte Proteine, die ein sog. HIS-Epitop, 6 Histidinreste am C- oder N-terminalen Ende, besitzen, lassen sich über eine Metallchelate-Affinitätschromatographie reinigen (Staropoli, 1997). Das aufzureinigende Protein wurde dabei in den Kulturüberstand sezerniert.

Es wurde rekombinantes LT $\beta$ R:Ig-Fusionsprotein aus Schneider S2 Zellkulturüberständen unter nativen Bedingungen gereinigt. Dazu wurden Zellen bzw. Zellreste durch zehnmündige Zentrifugation bei 4°C und 12000rpm in einer Beckmann-Zentrifuge aus dem Überstand entfernt. Dieser wurde durch Zugabe von zehnfach konzentriertem Bindungspuffer auf die für die Bindung notwendigen Salz- und pH-Verhältnisse eingestellt. Zur Bindung (20 min bei RT unter vorsichtigem Schütteln, Schaumbildung vermeiden) wurde Ni-NTA-Agarose zugegeben, die mit einfach konzentriertem Bindungspuffer equilibriert worden war. Danach schlossen sich zwei Waschschrötte mit einfach konzentriertem Bindungspuffer für je 15min bei RT und drei Waschschrötte mit nativem Waschpuffer pH 6,0 für ebenfalls je 15 min bei RT an. Die Elution (20min bei RT unter Schütteln) erfolgte in nativem Waschpuffer pH 6,0 mit 500mM Imidazol. Das Eluat wurde über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

#### 3.3.3 Messung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde der DC Protein Assay Kit verwendet. Hierbei handelt es sich um einen colorimetrischen Nachweis von Proteinkonzentrationen in Anlehnung an den bekannten Lowry-Assay. Der Nachweis erreicht 90% der maximalen Farbentwicklung bereits nach 15 min.

Der Nachweis basiert auf der Reaktion von Protein mit Kupfertartrat-Lösung und Folins-Reagenz. Wie auch beim Lowry-Assay, besteht der BioRad DC Assay Kit aus zwei Stufen, die zur Farbreaktion führen: Die Reaktion zwischen Protein und Kupfer in alkalischer Lösung und die nachfolgende Reduktion von Folins-Reagenz durch das Kupfer behandelte Protein. Die Farbreaktion ist primär abhängig von den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, und in einem geringeren Maße von Cystin, Cystein und Histidin. Die Proteine verursachen die Reduktion von Folins-Reagenz durch den Verlust von ein, zwei oder drei Sauerstoffatomen. Daher können mehrere reduzierte Spezies entstehen, mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm und einem Absorptionsminimum bei 405 nm.

Vorgehensweise bei der Versuchsdurchführung: Von Proteinstandardlösung bzw. den zu bestimmenden Proben werden 5 µl in Mikrotiterplatten pipettiert. Daraufhin werden 25µl der alkalischen Kupfertartrat-Lösung hinzugefügt. Anschließend werden 200µl Folins Reagenz zugesetzt und für 15 min im Dunkeln stehen gelassen. Die Absorption wurde bei 750 nm bestimmt.

### 3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht in SDS-Polyacrylamid-Gelen, die aus Sammel- und Trenngel bestanden, aufgetrennt (Lämmli, 1970). Die Elektrophorese wurde bei 0,8mA/cm<sup>2</sup> durchgeführt. Anschließend wurde das Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

Sammelgel (3%):	Acrylamid-Stammlösung (30%)	0,85ml
	Sammelgel-Trispuffer (pH 6.8)	1,5ml
	H <sub>2</sub> O	3,75ml
	SDS (10%)	60µl
	APS (10%)	50µl
	TEMED	5µl
Trenngel (6%):	Acrylamid-Stammlösung (30%)	3,25ml
	Trenngel-Trispuffer (pH 8.8)	3,75ml
	H <sub>2</sub> O	8ml
	SDS (10%)	150µl
	APS (10%)	100µl
	TEMED	10µl

### 3.3.5 Coomassie-Färbung

Zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen oder auf Nitrozellulosemembranen wurde eine Färbung mit Coomassie-Blau durchgeführt. Dazu wurden Gele oder Membranen zunächst für 5 bis 10 min in Färbelösung (0,25% Coomassie Blue R250/L, 45% Methanol, 10% Essigsäure) gelegt und anschließend in Entfärbelösung (40% Methanol, 10% Essigsäure) gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

### 3.3.6 Western Blot

Zur Detektion der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels Western-Blot, wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Western Blot; Towbin, 1979). Dazu wurden je drei Whatmanpapierstücke in Gelgröße in den Transferpuffern A (0.3M Tris Base, pH 10,4; 20% Methanol), B (25mM Tris Base, pH 10,4; 20% Methanol) und C (4mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, pH 7,6; 20% Methanol) getränkt. Zunächst wurden je drei Whatmanpapierstücke A und B auf die Anodenplatte der Blotapparatur gelegt. Die Nitrozellulosemembran wurde mit Methanol befeuchtet, in Puffer B gespült und auf Whatmanpapierstücke B gelegt. Anschließend wurde das Gel aufgelegt, mit drei Lagen Whatmanpapier C bedeckt und die Apparatur mit der Kathodenplatte geschlossen. Der Proteintransfer erfolgte durch Anlegen einer elektrischen Spannung für 0,8h bei 1mA/cm<sup>2</sup>.

Die auf die Nitrozellulosemembran geblotteten Proteine wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Diese wurden mit einem sekundären, Meerrettichperoxidase (HRP)-markierten Antikörper nachgewiesen werden. In beiden Fällen wurde die Membran nach dem Proteintransfer in 0,1% PBS-T mit 1% (w/v) Magermilchpulver für 30 min blockiert und anschließend für 1h mit den entsprechenden Antikörpern in der angegebenen Konzentration inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Membran mit PBS-T und einmaligem Waschen mit PBS, wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper versetzt. Vor der Detektion wurde die Membran fünfmal mit PBS-T und mindestens einmal mit PBS gewaschen. Die Detektion des HRP-gekoppelten Antikörpers erfolgte mit dem ECL-Western-Blot-System (EnerGene). Die Nachweisreaktion beruht auf einer Chemolumineszenzreaktion, die durch die HRP-katalysierte Oxidation eines Substrats (Luminol) hervorgerufen wird. Diese Lichtemission kann anschließend auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm-ECL) sichtbar gemacht werden.

### 3.3.7 Biotinylierung von Antikörpern

Zur Biotinylierung von Antikörpern wird ein Biotinyl- $\epsilon$ -Aminocapronsäure-N-Hydroxysuccinimidester (Biotin-X-NHS) eingesetzt, der spontan bei Zugabe zu Proteinen hydrolysiert und dabei das Biotin-X über eine kovalente Peptidbindung an die  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysin-Reste koppelt. Der aliphatische  $\epsilon$ -Aminocapronsäure-Rest (X) zwischen dem Biotin-Molekül und der reaktiven Gruppe fungiert dabei als „Spacer“, um einer sterischen Behinderung zwischen dem IgG-Molekül und dem kleineren Biotin-Molekül entgegenzuwirken.

Das Biotinylierungsreagenz Biotin-X-NHS wird unmittelbar vor der Reaktion in Dimethylformamid (DMF) gelöst, um die Eigenhydrolyse gering zu halten. Zur Biotinylierung werden zu 1mg Antikörper (1mg/ml) 100 $\mu$ l Biotin-X-NHS-Lösung (1mg/ml in DMF)

zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Reaktionsansatz wird anschließend über Nacht gegen PBS dialysiert.

### 3.3.8 FITC-Markierung von Proteinen

Zur direkten Fluoroisothiocyanat (FITC) Markierung von Proteinen wurde folgender Reaktionsansatz verwendet: 1mg Protein wurde mindestens 48 h bei 4°C gegen FITC-Labelling-Puffer dialysiert. Daraufhin wurden zum dialysierten Protein 20 µl einer FITC-Stock Lösung hinzugefügt und 2 h bei RT unter leichtem schwenken inkubiert. Um ungebundenes FITC aus dem Reaktionsansatz zu entfernen wurde der Ansatz viermal jeweils gegen 5 Liter des FITC-Dialyse-Puffers für 2 Tage, bei 4°C, dialysiert. Abschließend wurde das FITC markierte Protein im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

## 3.4 Zellbiologische Methoden

### 3.4.1 Zellkulturbedingungen

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilbank (Laminair Flow) durchgeführt. Alle verwendeten Zelllinien bzw. Primärkulturen wurden in Kulturflaschen mit dem angegebenen Medium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank (Cell Safe) kultiviert. Falls nicht anders angegeben wurden die Zellen dreimal wöchentlich im Verhältnis 1:5 geteilt. Medienwechsel oder Waschschrte wurden ausgeführt, indem die Zellen in sterilen Falconröhrchen 5 min bei 1000 bis 1200 zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in der entsprechenden Lösung resuspendiert wurde.

### 3.4.2 Zellkulturmedien

Die verwendeten Zelllinien wurden in folgenden Medien kultiviert

BFS-1	RPMI 1640, 10% FCS, Gentamycin (50 µg/ml)
EL4 5D3	RPMI 1640, 10% FCS, Gentamycin (50µg/ml), 10 <sup>-5</sup> M β-Mercaptoethanol
ESB	RPMI 1640, 10% FCS, Gentamycin (50µg/ml), 10 <sup>-5</sup> M β-Mercaptoethanol
L138.8	IMDM, 20% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 20 U/ml IL3 und 200ng/ml stem cell factor
PMMI	RPMI 1640, 10% FCS, Gentamycin (50µg/ml), 10 <sup>-5</sup> M β-Mercaptoethanol
X63Ag8-653	RPMI-1640, 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 10 <sup>-5</sup> M β-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 1mg/ml G418



### 3.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen, die langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert werden sollten, wurden zunächst bei 1200rpm pelletiert und in einer Konzentration von ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in kaltem Einfriermedium (40% RPMI 1640; 50% FCS; 10% Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Anschließend wurden Aliquots zu 1,8ml in Kryoröhrchen gefüllt, bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren und nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

Sollten tiefgefrorene Zellen erneut in Kultur genommen werden, wurde die Zellsuspension aufgetaut, in wenig Medium gewaschen und in frisches Kulturmedium überführt.

### 3.4.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Sollten Zellen in einer definierten Zellzahl in die entsprechenden Kulturgefäße eingesät werden, wurde mittels Trypanblau-Ausschlußtest die Anzahl der lebenden Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu wurden 100µl einer Zellsuspension 1:1 mit Trypanblaulösung versetzt. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zahl an lebenden Zellen, die sich nicht durch Trypanblaulösung anfärben ließen, mikroskopisch ermittelt.

Die Zellkonzentration wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Anzahl der Zellen in 16 Kleinquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl} \times 10^4 / \text{ml}$$

### 3.4.5 Mycoplasmentest

In regelmäßigen Abständen wurden sämtliche Zelllinien mit Hilfe des Mycoplasma Detection Kits auf einen Mycoplasmenbefall untersucht.

### 3.4.6 Experimente mit primären vom Knochenmark stammenden polyklonalen Mastzellen (Bone marrow-derived mast cells = BMMC)

Bei allen Experimenten mit BMMC wurden diese bei maximal 700 U für 5 min zentrifugiert.

#### 3.4.6.1 Gewinnung und Kultur primärer von BMMC

Als Spender für das Knochenmark dienten weibliche BALB/c, C57BL/6 WT bzw. C57BL/6 LTβR<sup>-/-</sup> Mäuse im Alter von etwa 4 Monaten. Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet, das Fell mit Ethanol (70%) desinfiziert und von der betreffenden Körperhälfte abpräpariert. Der Femur wurde unter sterilen Bedingungen stumpf von der Muskulatur befreit, die Diaphyse mit einer Pinzette fixiert und die distale Epiphyse des Femurs durch Drehen der unteren Gliedmasse abgetrennt. Proximal wurde der Femur mittels Scherenschlag abgetrennt.

Zum Entnehmen des Knochenmarks wurde eine Injektionsnadel (21 Gauge) mit angesetzter 5 ml Spritze vorsichtig in die eröffnete Markhöhle unter drehender Bewegung eingeführt und

das Knochenmark durch wiederholtes Spülen mit kaltem (4°C) RPMI-1640 Medium in ein steriles 50 ml Falconröhrchen herausgewaschen. Aus dem so gewonnenen Knochenmark wurde durch wiederholtes vorsichtiges Pipetieren eine homogene Einzelzellsuspension hergestellt.

### **3.4.6.2 Selektion und Kultur von Mastzellen**

Eine definierte Zellmenge ( $3 \times 10^6$  Zellen/ml) wurde in ein Nährmedium bestehend aus IMDM (GIBCO/Invitrogen), 20% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 20 U/ml IL-3 und 200 ng/ml stem cell factor (SCF, c-kit ligand, erhalten von Herrn Dr. Lothar Hültner, GSF, München) gegeben. Nicht adhärente Zellen wurden alle zwei bis drei Tage, für eine Dauer von mindestens 28 Tagen, in frisches Medium gegeben um adhärierende Makrophagen und Fibroblasten abzutrennen. Danach wurde der Anteil der Mastzellen in Zytozentrifugenpräparaten mittels May-Grünwald- bzw. Toluidinblau-Färbung bestimmt.

### **3.4.6.3 Zytozentrifugenpräparate**

Pro Präparat wurden 200 µl Zellsuspension ( $1 \times 10^5$  Zellen in PBS mit 50% FCS) 5 min lang bei 700 U (Cytospin-Zentrifuge) auf Objektträger zentrifugiert, über Nacht luftgetrocknet, mit verschiedenen Methoden gefärbt und mit Entellan eingedeckt.

Wie unter 3.5.7 dargestellt wurden primäre vom Knochenmark stammende polyklonale Mastzellen zur phänotypischen Charakterisierung mit den nachfolgenden Methoden gefärbt. Grundsätzlich wurden für jede Anzucht drei unabhängige Versuche durchgeführt.

### **3.4.6.4 May-Grünwald-Giemsa-Färbung**

Die Präparate wurden zuerst mit konzentrierter May-Grünwald-Lösung 4 min lang gefärbt, kurz abgetropft und dann für 6 min in Giemsa-Lösung (7% Giemsa in Puffer nach Weise, pH 7,2) gegengefärbt, anschließend 5 min in Weise Puffer gewaschen, an der Luft getrocknet und mit Entellan eingedeckt.

### **3.4.6.5 Toluidinblau-Färbung**

Die Präparate wurden in der Farbstofflösung (1g Toluidinblau in 100ml Methanol) 5 min lang gefärbt, anschließend mit Leitungswasser für 4 min gewaschen, luftgetrocknet und mit Entellan eingedeckt.

### **3.4.6.6 Induktionsexperimente**

Mit Hilfe dieser Versuche wurden BMMC zur Freisetzung neu synthetisierter Zytokine veranlasst. Ionomycin, ein Kalziumionophor, führt zum Einstrom extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und erhöht so den intrazellulären Kalziumspiegel dieser Zellen. Dies spiegelt einen Prozess

wieder, der auch nach physiologischer Aktivierung von Mastzellen mittels Quervernetzung des hoch affinen IgE-Rezeptors (FcεRI) abläuft. Durch zusätzliche Applikation von 5G11b bzw. mLIGHT wurde die kalziumvermittelte Freisetzung von Zytokine nach LTβR-Stimulation analysiert.

In allen Experimenten wurden  $1 \times 10^6$  BMMC pro ml Zellkulturmedium eingesetzt. Die Versuche wurden in 24-well Platten mit 1ml/well durchgeführt. Für jeden Stimulationsansatz wurden Dreifachwerte ermittelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Kulturüberstände mittels Zentrifugation zellfrei gewonnen und bei -20°C bis zur weiteren Analyse der Zytokinkonzentrationen aufbewahrt.

### **3.4.6.7 Cokulturrexperimente mit aktivierten T-Zellen und BMMC**

T-Zellen wurden durch Inkubation mit PMA und Ionomycin (500ng/ml) für 14 h stimuliert und anschließend dreimal mit RPMI-1640 Medium gewaschen um alles PMA und Ionomycin zu entfernen. Daraufhin wurden die so stimulierten T-Zellen in ansteigendem Verhältnis, bei konstanter BMMC Zahl ( $1 \times 10^5$ ), für 24 h in RPMI1640 Medium (10% FCS, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin) kokultiviert. Die Kulturüberstände wurden für 5 min bei 10 000 U zentrifugiert und auf die Konzentrationen der angegebenen Zytokine mittels ELISA untersucht.

### **3.4.6.8 β-Hexosaminidase Freisetzung**

BMMC ( $1 \times 10^5$  Zellen/100µl/well) wurden in Tyrode's Puffer (TB) suspendiert (37°C), mit mLIGHT, 5G11b oder PMA/Ionomycin-aktivierte T-Zellen versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zur Induktion der Zytokinfreisetzung 0,5µM Ionomycin, in 50 µl TB, zugefügt (außer bei Cokulturrexperimenten mit aktivierten T-Zellen und BMMC, hier wurde kein zusätzliches Ionomycin zugegeben), und für weitere 30 min 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen pelletiert (1200 rpm, 4°C) und die Zellkulturüberstände abgenommen. Das Zellpellet wurde mit 200 µl/well 0.5% Triton X-100 Lösung lysiert. Aliquots (20µl) der Zellkulturüberstände oder der Zell-Lysate wurden mit β-Hexosaminidase-Enzym-Substrat-Lösung (50µl pro Ansatz) versetzt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 250 µl eines 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> Puffer (pH 10) zugegeben und die Absorption bei 410nm in einem ELISA Reader gemessen. Die Werte geben die Prozentzahl an freigesetzter β-Hexosaminidase an (total β-Hexosaminidase = einzelner Zellkulturüberstand + dazugehörendes Lysat).

### 3.4.7 Gewinnung einer Zellsuspension aus mesenterialen Lymphknoten

Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und das Fell mit Ethanol (70%) desinfiziert. Die mesenterialen Lymphknoten wurden unter sterilen Bedingungen aus der Bauchhöhle entfernt und in sterilen 50 ml Falconröhrchen, die jeweils 20 ml RPMI-1640 beinhalten, auf Eis bis zur weiteren Aufbereitung zwischengelagert. Die mesenterialen Lymphknoten wurden unter sterilen Bedingungen durch ein Zellsieb gedrückt, wodurch eine Einzelzellsuspension erhalten wurde. Diese wurde vor weiterer Verwendung nochmals mit 20 ml RPMI-1640 Medium gewaschen.

### 3.4.8 Durchflußzytometrie

#### 3.4.8.1 Allgemeine Durchflußzytometrie

Alle durchflußzytometrischen Messungen wurden auf einem FACscan Flow Cytometer durchgeführt, als Listmode-Dateien gespeichert und die Auswertung in WinMDI 2.8 vorgenommen. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienten FITC und PE Farbstoffe. Die Messungen wurden mit 3 bzw. 4 Parametern durchgeführt, die folgendermaßen belegt waren:

1. Forward scatter (FSC)	Zellform/Zellgröße
2. Sideward scatter (SSC)	Granularität
3. Fluoreszenzkanal 1 (FI1-H)	FITC-Fluoreszenzintensität
4. Fluoreszenzkanal 2 (FI2-H)	PE-Fluoreszenzintensität

Alle Parameter wurden bei der Auswertung logarithmisch aufgetragen.

Zur durchflußzytometrischen Untersuchung von Zellen wurden diese mit PBS (10% FCS v/v) gewaschen und auf FACS-Röhrchen verteilt (ca.  $1 \times 10^6$  Zellen). Daraufhin wurden die Zellen bei 1200 U pelletiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die anschließende Inkubation mit den Antikörpern (10 µg/ml) fand in einem Reaktionsvolumen von 100 µl statt. Nach Inkubation der Zellsuspension für 30 min wurden die Zellen in 1 ml PBS (10% FCS v/v) resuspendiert und bei 1200 U wiederum pelletiert. Es folgte ein weiterer Waschschriff. Nach Abtrennen des Überstandes erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (10 µg/ml) für 30 min. Alle Inkubationen wurden auf Eis und soweit farbstoffmarkierte Antikörper beteiligt waren im Dunkeln durchgeführt. In der Regel wurde jede Inkubation für 30 min durchgeführt und zwischen den einzelnen Inkubationsschritten zweimal mit PBS gewaschen. Alle Antikörperverdünnungen wurden mit PBS, das 10 % FCS beinhalten, hergestellt.

### 3.4.8.2 Durchflusszytometrie von BMMC

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen an BMMC wurden genauso durchgeführt wie bei anderen Zellsuspensionen auch. Mit Ausnahme eines vorgeschalteten Blockierungsschrittes. Hierzu wurden die BMMC-Suspensionen mit 100 µl einer 1mg/ml Maus IgG Lösung für 30 min auf Eis inkubiert, um Fc-Rezeptoren auf den BMMC zu blockieren.

## 3.5 Immunologische Methoden

### 3.5.1 Allgemeine ELISA Methode

In einem ELISA wird das Antigen entweder direkt an eine Mikrotiterplatte gebunden und über einen Antikörper nachgewiesen oder man verfährt nach dem sogenannten „Sandwich“-Prinzip.

Die Mikrotiterplatte wird dazu mit einem „Fang-Antikörper“ beschichtet. Nach Inkubation mit der antigenhaltigen Probelösung wird das an den „Fang-Antikörper“ gebundene Antigen mit einem zweiten Antikörper, dem sog. Sekundärantikörper, nachgewiesen, wobei der Sekundärantikörper, mit einem Enzym gekoppelt sein kann. Bei unmarkierten Sekundärantikörpern verwendet man einen dritten Antikörper, der den Sekundärantikörper erkennt und eine Enzymmarkierung trägt. Am häufigsten werden Antikörper mit den Enzymen Peroxidase (POX), stammt sie aus dem Meerrettich wird sie mit „HRP“ abgekürzt, bzw. alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt. Biotinylierte Antikörper werden mit einem Streptavidin-POX- oder Streptavidin-AP-Komplex nachgewiesen. Die Menge an gebundenem, Enzym-markiertem Antikörper ist der Menge an gebundenem Antigen proportional und wird über den Umsatz eines geeigneten chromogenen Substrates photometrisch bestimmt.

### 3.5.2 ELISA zur Quantifizierung von mLTβR:Ig-Titern in Seren

Als „Fang-Antikörper“ wurde der monoklonale Antikörper 5G11b, ein Ratte-anti-Maus LTβR Antikörper, in einer Konzentration von 2µg/ml an eine Mikrotiterplatte immobilisiert. Zur Beschichtung der Mikrotiterplatte wurde diese mit 50µl/Napf der 5G11b Lösung entweder über Nacht bei 4°C oder zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden alle unbesetzten Proteinbindungsstellen mit 200µl Blockierlösung pro Napf für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend folgten drei Waschschrte mit 200µl 0,1% PBS-T pro Napf. Nun erfolgte der Probenauftrag mit 50µl/well. Das mLTβR:Ig-Protein wurde aus Kulturüberstand von Schneider S2 Zellen gereinigt wie unter 3.3.2 beschreiben. Die Standardverdünnungsreihe umfasste mLTβR:Ig Konzentrationen von 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 und 1,56ng/ml in PBS. Als Negativkontrolle diente PBS. Die Inkubation mit den

Proben dauerte 1 h bei RT. Vor der Zugabe des Sekundärantikörpers erfolgte ein erneuter dreimaliger Waschschriff mit 0,1% PBS-T. Als Sekundärantikörper wurde ein mit Biotin markierter IC5 Antikörper, ein Ratte anti-Maus-LT $\beta$ R Antikörper, der ein anderes Epitop als der 5G11b erkennt, in einer Konzentration von 2 $\mu$ g/ml eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1% PBS-T wurde mit AP-gekoppeltem Streptavidin für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte dreimal gewaschen und jeder Napf mit 50 $\mu$ l Substratlösung (Sigma 104) gefüllt. Nach Entwicklung der Farbreaktion wurde die Absorption der Substratlösung bei 405nm in einem ELISA Reader (MWG Biotech, Ebersberg) gemessen .

### **3.5.3 ELISA zur Quantifizierung von IL-4, IL-6, MIP-2, TNF und RANTES**

Die Quantifizierung wurde mit den entsprechenden ELISA-Kits nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Bei diesen ELISAs liegt ebenfalls das „Sandwich“-Prinzip zugrunde. Zur Probenvorbereitung wurde Zellkulturüberstand abgenommen und zentrifugiert, um eventuell verbliebene Zellen zu pellettieren. Der daraus resultierende Überstand wurde für die Quantifizierung eingesetzt. Zur Entwicklung der ELISAs wurde ABTS gelöst in ABTS Puffer verwendet und die Absorption bei 405 nm gemessen.

### **3.5.4 Serumgewinnung aus Mausblut**

Blut aus Mäusen wurde durch retro-orbitales Bluten unter Anästhesie (Ketanest und Rompun) gewonnen. Das Blut wurde 2 h bei 4°C stehen gelassen. Anschließend wurde der Blutkuchen für 5 min bei 10 000 U abzentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde abgenommen und bei -20°C gelagert.

## **3.6. Immunohistochemische Verfahren**

### **3.6.1 MadCAM-1-Färbung von Masedickdarm**

Hierfür wurden 5-8 $\mu$ m dicke Kryo-Schnitte von distalen Dickdarmstücken angefertigt und luftgetrocknet. Anschließend erfolgte ein Fixierungsschritt mit -20°C kalten Aceton für 20 min. Die Schnitte wurden dreimal mit PBS gewaschen und um endogene Peroxidasen zu blockieren mit einer 3% Wasserstoffperoxidlösung für 10 min inkubiert. Es erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit PBS mit nachfolgendem Blockieren von unspezifischen Bindungen mit 10% BSA Lösung (in PBS). Danach wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte für 1 h bei RT, wobei MadCAM-1 (1:50)-Antikörper verwendet wurden und als Negativkontrolle Ratten-IgG<sub>2a</sub>-Antikörper dienten. Vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde Kanninchen-anti-Ratten-IgG-Pox Antikörper

verwendet (1:200, 30 min bei RT). Darauf hin wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Jetzt erfolgte die Peroxidase-Entwicklung mittels DAB-Reagenz (1:50), was zu einer Braunfärbung führte. Die Reaktion wurde durch waschen mit demineralisiertem Wasser abgestoppt. Abschließend wurde mit Hämatoxylin gegengefärbt und die Schnitte mit Entellan eingedeckelt.

### **3.6.2 PNAd-Färbung von Mause Dickdarm**

Hierfür wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerte distale Dickdarmstücke verwendet. Aus diesen wurden, in einer Kryostat-Scheidemaschine, bei  $-23^{\circ}\text{C}$ , 5-8 $\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt und luftgetrocknet. Anschließend erfolgte ein Fixierungsschritt mit  $-20^{\circ}\text{C}$  kalten Aceton für 20 min. Die Schnitte wurden dreimal mit PBS gewaschen und um endogene Peroxidasen zu blockieren mit einer 3% Wasserstoffperoxidlösung für 10 min inkubiert. Es erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit PBS mit nachfolgendem Blockieren von unspezifischen Bindungen mit 10% BSA Lösung (in PBS). Danach wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte für 1 h bei RT, wobei PNAd-Antikörper (1:100) verwendet wurden und als Negativkontrolle Ratten-IgM-Antikörper dienten. Vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde Kaninchen-anti-Ratten-IgM-Biotin Antikörper verwendet (1:200, 30 min bei RT). Darauf hin wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen, mit Streptavidin-HRP inkubiert (1:500, 30 min bei RT) und dreimal mit PBS gewaschen. Jetzt erfolgte die Peroxidasen-Entwicklung mittels DAB-Reagenz (1:50), was zu einer Braunfärbung führte. Die Reaktion wurde durch Waschen mit demineralisiertem Wasser abgestoppt. Abschließend wurde mit Hämatoxylin gegengefärbt und die Schnitte mit Entellan eingedeckelt.

### **3.6.3 Follikulär Dendritische Zellen (FDC)-Färbung von Mausmilz**

Bei dieser Färbung handelt es sich um eine Doppelfärbung. Daher musste sowohl bei der Zugabe der Erstantikörper als auch bei der Zugabe der Zweitantikörper jeweils zwei verschiedene Antikörper zugleich zugegeben werden. Ebenfalls musste zum Schluss sowohl die AP als auch die HRP getrennt voneinander entwickelt werden.

Es wurden von distalen Dickdarmstücken in einer Kryostat-Schneidemaschine, bei  $-23^{\circ}\text{C}$ , 5-8 $\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt und luftgetrocknet. Anschließend erfolgte ein Fixierungsschritt mit  $-20^{\circ}\text{C}$  kalten Aceton für 20 min. Die Schnitte wurden dreimal mit PBS gewaschen und um endogene Peroxidasen zu blockieren mit einer 3% Wasserstoffperoxidlösung für 10 min inkubiert. Es erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit PBS mit nachfolgendem Blockieren von unspezifischen Bindungen mit 10% BSA Lösung (in PBS). Danach wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation für 1 h bei RT mit den

Erstantikörpern: PNA-biotinyliert (1:100) zur Detektion der Zentroblasten und Ratte-anti-Maus-CD21/CD35 (1:100) zur Detektion der FDC. Als Negativkontrolle für den Nachweis von FDC wurde Ratten-IgG<sub>2a</sub> verwendet. Vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörpern wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurden verwendet: Maus-anti-Ratten-IgG POX (1:100) und Streptavidin-AP (1:500), wobei für 30 min bei RT inkubiert wurde. Darauf hin wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Jetzt erfolgte die HRP-Entwicklung mittels DAB-Reagenz (1:50), was zu einer Braun- bzw. Rotfärbung führte. Die Reaktion wurde durch waschen mit demineralisiertem Wasser abgestoppt. Abschließend erfolgte noch die AP-Entwicklung mit Vector Blue Kit, nach den Vorschriften des Herstellers.

Die oben beschriebene Färbung führt dazu, dass die FDC durch Anlagerung von anti-Maus-CD21/DC35 und daran gebundenem anti-Ratten-IgG-POX, durch DAB-Entwicklung braun bzw. rot angefärbt werden. Wohingegen die Zentroblasten durch Anlagerung von biotinyliertem PNA und weiterem Streptavidin-AP blau angefärbt werden.

### 3.7 Mäuse

Alle verwendeten Tiere waren entsprechend der Haltungsvorschriften untergebracht, hatten einen 12 Stunden Hell-Dunkel Rhythmus und erhielten die speziesspezifische Standarddiät und Leitungswasser ad libitum.

Für Experimente mit experimenteller Colitis wurden weibliche BALB/c, C57BL/6 und LT $\beta$ R<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäuse verwendet. Die BALB/c und C57BL/6 Mäuse wurden von Charles River, Sulzfeld bezogen. Die LT $\beta$ R<sup>-/-</sup> Mäuse wurden von Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer, Med. Mikrobiologie/Hygiene und Immunologie, TU-München freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Besonders wichtig war, dass Mäuse vor Beginn der Colitis-Induktion mindestens 22 g Gewicht hatten.

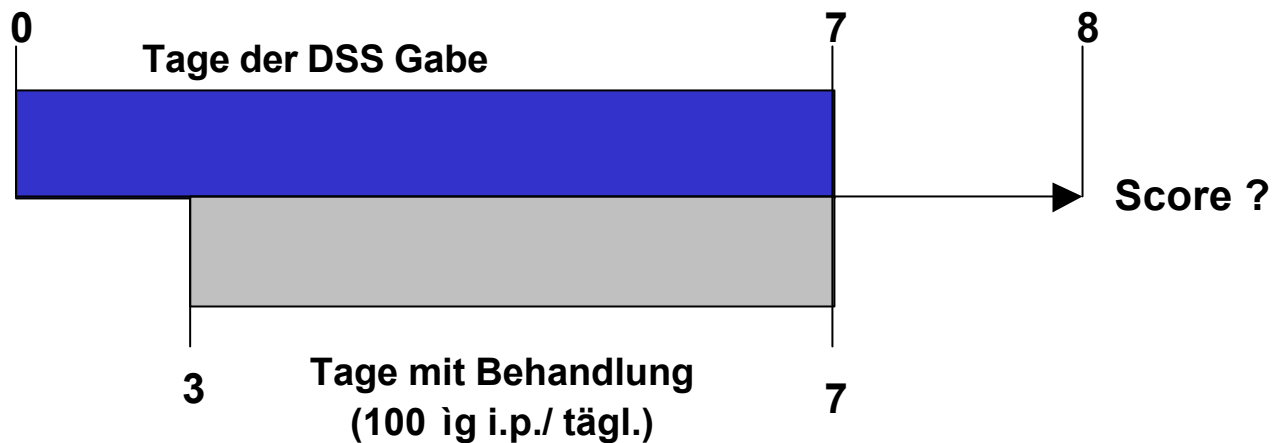
Als Spender für das Knochenmark dienten ebenfalls weibliche BALB/c, C57BL/6 Wildtyp bzw. C57BL/6 LT $\beta$ R<sup>-/-</sup> Mäuse.

### 3.8 Induktion einer experimentellen akuten und chronischen Colitis mit Dextransulfat (DSS)

#### 3.8.1 Induktion einer experimentellen akuten Colitis

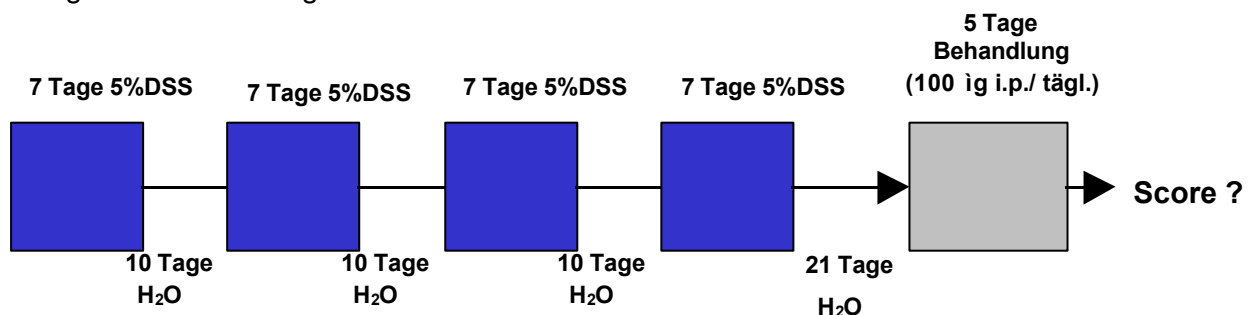
Zur Induktion einer akuten Colitis wurde weiblichen BALB/c Mäusen (Körpergewicht mindestens 22g) 5% Dextransulfat (DSS, MG 36000-50000) im Trinkwasser über sieben Tage gegeben (Okayasu, 1990). Während dieses Zeitraumes erfolgte auch die Behandlung der Mäuse von Tag drei bis Tag sieben mit den angegebenen Antikörpern i.p.. Die Mäuse wurden an Tag 8 mittels Genickbruch getötet.





### 3.8.2 Induktion einer experimentellen chronischen Colitis

Zur Induktion einer chronischen Colitis erhielten weibliche BALB/c Mäuse (Körpergewicht mindestens 22g) 4 Zyklen mit 5%iger DSS-Behandlung mit jeweils dazwischenliegenden zehntägigen Gaben von normalen Trinkwasser. Etwa 21 Tage nach der letzten DSS-Gabe erfolgte die Behandlung der Mäuse.



## 3.9 Bestimmung von Entzündungsparametern des Dickdarmes

### 3.9.1 Histologischer Score

Am Tag nach der jeweils letzten Behandlung wurden die Mäuse mittels Genickbruch getötet, der Dickdarm herauspräpariert und von Stuhlpellets befreit. Der Dickdarm wurde der Länge nach aufgeschnitten und mit PBS gewaschen. Danach wurde vom distalen Teil des Darmes etwa 1,5 cm abgeschnitten und über Nacht in 10% Formaldehyd (in PBS) fixiert und am nächsten Tag mittels unterschiedlichen Ethanol Konzentrationen entwässert. Am nächsten Tag wurden die Darmstücke in Paraffin eingebettet. Von den paraffinierten Darmstücken wurden je drei 3µm dicke Längsschnitte in Abstand von 100µm angefertigt. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und histologisch beurteilt („verblindet“). Alle drei Schnitte pro Dickdarm erhielten einen Score und der daraus resultierende Mittelwert repräsentierte den jeweiligen histologischen Score des Tieres.

Zur histologischen Beurteilung wurde folgender Score aufgestellt:

Score	Epithelschaden	Infiltrat
0	Normale Morphologie	Kein Infiltrat
1	Verlust einzelner Becherzellen	Wenig Infiltrat, an der Kryptenbasis
2	Flächenhafter Verlust von Becherzellen	Infiltrat zwischen Krypten und Muscularis Mucosae
3	Kryptenverlust	Mehr Infiltrat, mit Oedem (Gewebe aufgeschwollen)
4	Flächenhafter Kryptenverlust	Infiltrat durch Muscularis Mucosae reichend bis in die Submucosa

Die histologischen Unterscores Epithelschaden und Infiltration wurden einzeln bewertet (jeder einzelne Parameter war von 0 bis 4 abgestuft). Der histologische Gesamtscore einzelner Mäuse wurde aus der Summe der histologischen Unterscores berechnet (Gesamtscore = Epithelschaden + Infiltration). Hieraus ergibt sich ein maximaler Gesamtscore von 8.

### 3.9.2 Bestimmung des Lymphfollikel-Scores

Zur Bestimmung des Lymphfollikel-Scores wurden die Dickdarmpräparate wie in 3.9.1 aufgearbeitet jedoch mit folgenden Score bewertet, wobei pro Schnitt ein Abschnitt von 1cm bewertet wurde.

Score	Lymphfollikel/Schnitt
0	Kein Lymphfollikel
1	1 Lymphfollikel
2	2 Lymphfollikel
3	3 Lymphfollikel
4	4 oder mehr Lymphfollikel

### 3.9.3 Gewichtsveränderung

Bei der Induktion der akuten Colitis wurde bei den Tieren täglich das Körpergewicht gemessen und der auftretende Gewichtsverlust in Prozent des anfänglichen Gewichtes ausgedrückt.

### 3.9.4 Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität

Zur Bestimmung der Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität als Maß für die Neutrophileninfiltration wurden Biopsien von 300mg aus dem mittleren Darmbereich in 500 µl Hexadecyltrimethylammoniumbromidlösung (HTAB-Lsg.: 0,5% HTAB in 50 mM Kalziumphosphatpuffer, pH 6,0) gegeben und bis zur Bestimmung der MPO Aktivität bei –20°C gelagert. Die Biopsien wurden in der HTAB-LSG mittels eines Ultra Turrax Stabes (IKA Labortechnik) homogenisiert (dreimal 30 s) und das Homogenisat drei schnellen Einfrier- und Auftauzyklen (flüssiger Stickstoff und 37°C Wasserbad) unterzogen. Nach einer Zentrifugation (14 000 U, 20 min) wurde im Überstand die MPO-Aktivität gemäß der Methode nach Bradley (1982) mit 0,0005% Wasserstoffperoxid als Substrat gemessen.

### 3.9.5 Dickdarmlänge

Am Tag nach der jeweils letzten Behandlung wurden die Mäuse mittels Genickbruch getötet, der Dickdarm herauspräpariert und von Stuhlpellets befreit. Da der Darm auf Grund der Präparation und der Stuhlpellets gedehnt war, wurde er zur Entspannung kurze Zeit liegengelassen. Danach wurde die Länge des Darms gemessen. Je länger der Dickdarm ist, desto weniger liegt eine entzündungsverursachte Verkürzung bzw. Ödembildung vor; d.h. je länger der Darm, desto weniger entzündet ist er.

### 3.10 *In Vivo* Fluoreszenzmikroskopie

Als Vorbereitung zur *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie wurden die Mäuse nach Prämedikation mit Atropin (0,1mg/kg Körpergewicht s.c.) durch einen konstanten Zufluss von Sauerstoff (33%) mit Isofluran (0,4vol%) und Stickstoff anästhesiert. Die Tiere wurden auf einer Heizplatte platziert um die Körpertemperatur zwischen 36°C und 37°C zu erhalten. Dies wurde durch ein rektal zugeführtes Thermometer überprüft. Die linke Halsvene wurde mit einem feinem Polyethylen Katheter (Innendurchmesser: 0,28mm; Portex Lynthe, Kent, UK) versehen. Dadurch konnte zum einen Substitution von verlorenen Blutvolumen während der Operation erfolgen, durch Zugabe von 40 ml/h/kg Ringer Lösung. Zum anderen wurden über diesen intravenösen Zugang die Fluoreszenz-Marker für die *in vivo* Mikroskopie verabreicht. Danach wurde nach transverser Laprotomie der absteigende bzw. distale Teil des Colons freigelegt.

Ein Teil des freigelegten distalen Colons, ungefähr 1cm Länge, wurde vorsichtig auf eine spezielle Platte, die etwa 0,5cm über der Maus lokalisiert war, gelegt und mit einem Deckglas versehen. Die so präparierte Maus wurde nun mitsamt der Heizplatte unter einem computerkontrolliertem Fluoreszenzmikroskop platziert (Zeiss Mikroskop). Während des Experiments wurde der Darm von außen mit 37°C temperierten Ringer Lösung beträufelt. Die

*in vivo* Mikroskopie wurde leicht verändert durchgeführt, wie sie bei Gonzalez (1994) beschrieben wurde. Es wurde eine Technische Ausrüstung verwendet wie sie bei Harris (1997) beschrieben wurde. Alle Aufnahmen wurden durch eine Video-Kamera, die an das Fluoreszenzmikroskop angeschlossen war, aufgenommen. Diese Aufnahmen wurden auf einem an die Video-Kamera angeschlossenen S-VHS Video Recorder (Panasonic) aufgenommen.

Die Mikrozirkulation in der Submukosa wurde beobachtet um die Lymphozyten Endothel Interaktionen in zehn zufällig ausgewählten Postkapillar- (PV) und Sammelvenolen (SV) zu untersuchen (Vergrößerung 600x). Lymphozyten wurden durch intravenöse Gabe von 0,02% Acridin-Orange Lösung (0,1mg/kg/min) für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Hierbei wurden die Lymphozyten in rollende, adhätierende und nicht adhätierende klassifiziert. In jedem Gefäß-Segment wurden Lymphozyten als adhärent angesehen, wenn sie sich in einem Beobachtungszeitraum von 30 s nicht vom Endothel ablösten. Die Daten wurden als Zellen pro mm<sup>2</sup> Endotheloberfläche angegeben. Rollende Lymphozyten werden als sich bewegende Zellen definiert, die sich mit weniger als zwei Drittel der Geschwindigkeit des zentralen Blutstromes fortbewegen. Sie wurden in rollenden Zellen im Verhältnis zum Gesamtlymphozytenstrom in % angegeben.

Für die Visualisation der Mikrozirkulation der Lymphozyten in der Mukosa wurde FITC markiertes Dextran i.v. injiziert. Um die Mikrozirkulation in der Mucosa beobachten zu können musste der Dickdarm der Länge nach aufgeschnitten werden (etwa 2cm) und von eventuellen Stuhlresten durch kräftiges Spülen mit PBS befreit werden. Auf die so freigelegte Mukosa wurde nun wiederum ein Deckglas gelegt um die markierten Lymphozyten besser beobachten zu können. Der Anteil an, in die Mukosa extravasierten, Lymphozyten wurde durch Angabe von Zellen pro mm<sup>2</sup> Mukosa angegeben. Ebenfalls wurden die an den Endothelien der Mukosa adhätierenden Lymphozyten in Zellen pro mm<sup>2</sup> Mukosa angegeben. Der gesamte Vorgang der *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie dauerte pro Tier in etwa 120 min. Am Ende des Experiments wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet und Dickdarmgewebe für weitere Versuche entnommen.

### 3.11 Statistik

Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (SD) angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede in Dickdarmlängen, Gewichtsverlust, MPO-Aktivität, histologischen Score, Lymphfollikel Score und bei den *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie-Experimenten wurden mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test bestimmt. Mit dem Student's T-Test wurden signifikante Unterschiede bei Zellkulturexperimenten mit BMMC und bei Zytokinexpressions-Experimenten von mesenterialen Lymphozyten bestimmt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Reinigung und Test der biologischen Aktivität des LT $\beta$ R:Ig-Fusionsproteins

#### 4.1.1 LT $\beta$ R:Ig-Fusionsprotein

Um die Aktivierung des LT $\beta$ R *in vivo* zu hemmen, wurde ein LT $\beta$ R:Ig-Fusionsprotein aus der Extrazellulärdomäne des mäuseichen LT $\beta$ R und dem Fc-Teil eines humanen IgG<sub>1</sub> hergestellt. LT $\beta$ R:Ig bindet auf Grund seiner doppelt vorhandenen LT $\beta$ R-Extrazellulärdomäne an die Liganden LT $\alpha_1\beta_2$  und LIGHT und verhindert so die LT $\beta$ R-Aktivierung (Abb. 4-1).

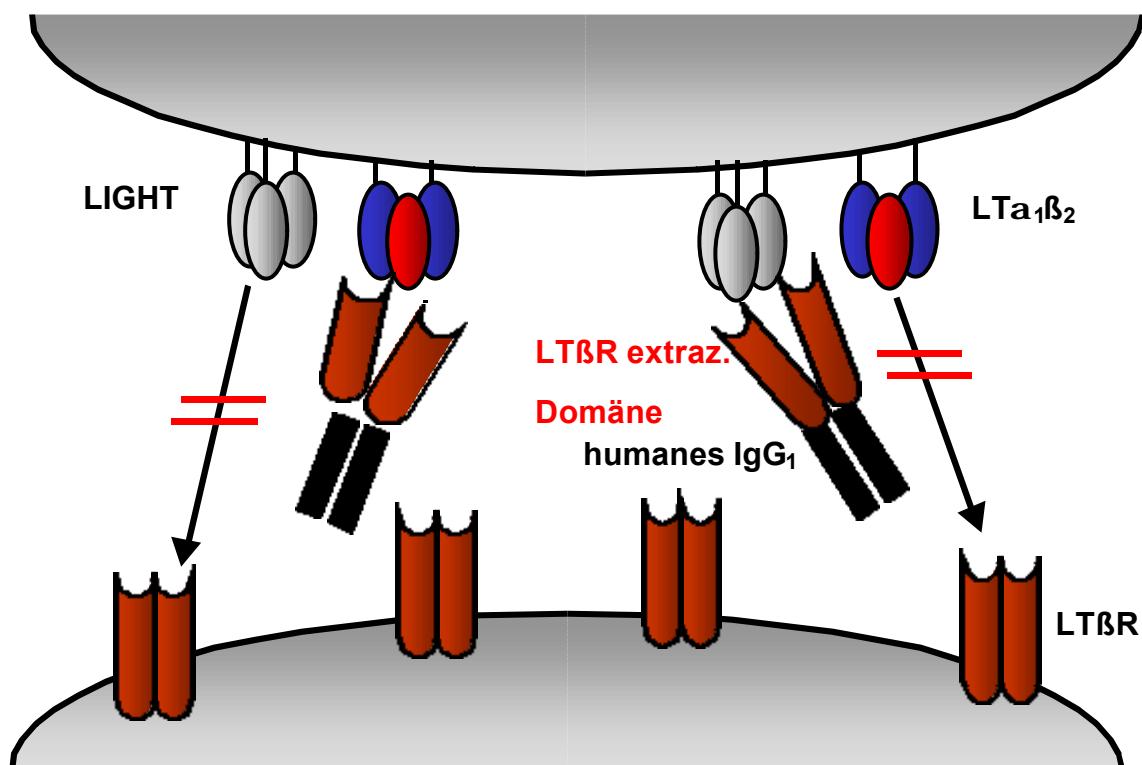
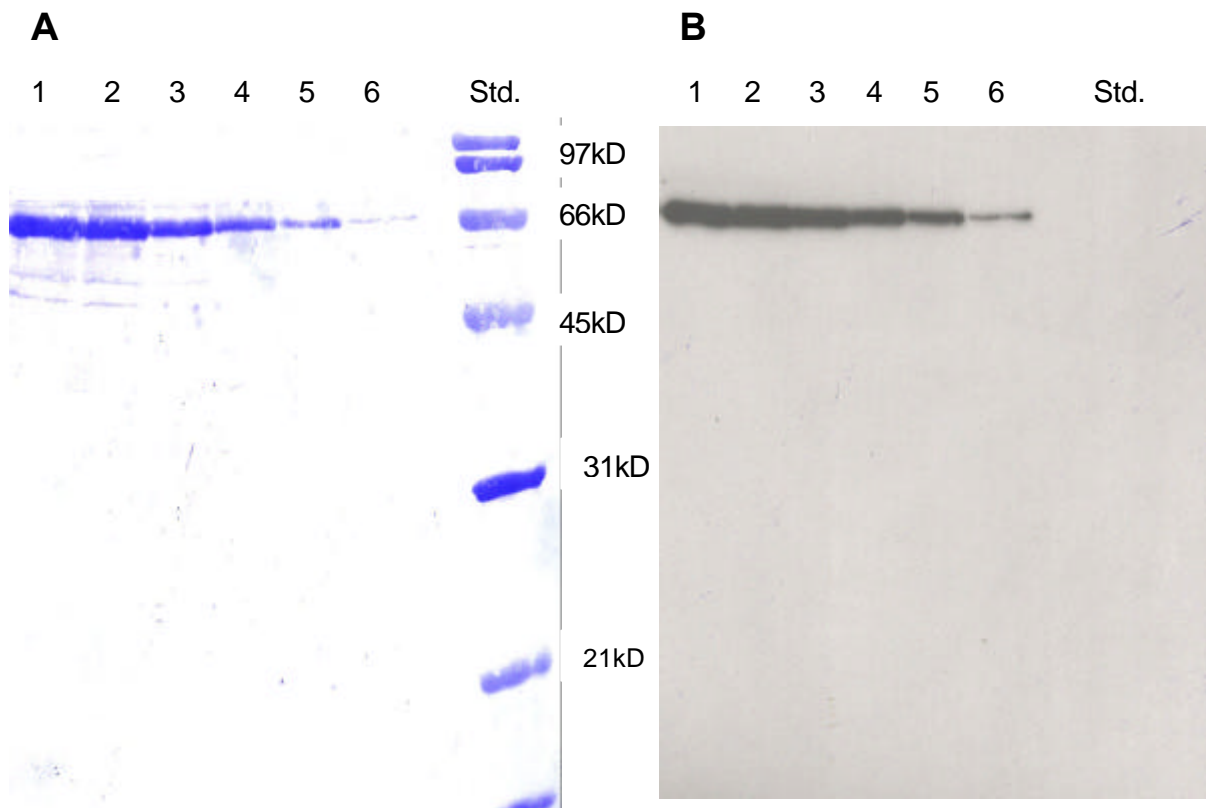


Abbildung 4-1:  
Blockade der LT $\beta$ R-Aktivierung durch LT $\beta$ R:Ig-Gabe.

#### 4.1.2 Reinigung

Das LT $\beta$ R:Ig wurde in Schneider Zellen (Drosophila Zellen) exprimiert und durch eine eingebaute leader-Sequenz in den Zellkulturüberstand sezerniert. Um das Fusionsprotein besser reinigen zu können, war es C-terminal mit einem His-tag, d.h. 6 aufeinanderfolgende Histidinreste, versehen. Aus einer Kooperation mit Achim Möller (Neuroscience Research Abbott GmbH, Ludwigshafen) erhielt ich S2-Zellkulturüberstand, aus dem das Fusionsprotein gereinigt wurde. LT $\beta$ R:Ig wurde an Ni-NTA Agarose gebunden und anschließend mit Imidazol, das höhere Affinität zu Ni-NTA Agarose besitzt als Histidin, eluiert, und gegen PBS dialysiert. Molekulargewicht und Reinheit des gereinigten Proteins wurden durch SDS Gel-Chromatographie, Western Blot und Coomassie-Färbung geprüft (Abb. 4-2). Sowohl in der

Coomassie-Färbung als auch im Western Blot war die LT $\beta$ R:Ig spezifische Bande bei 65kD. Die Reinheit des aufgereinigten Fusionsproteins lag bei etwa 95%.



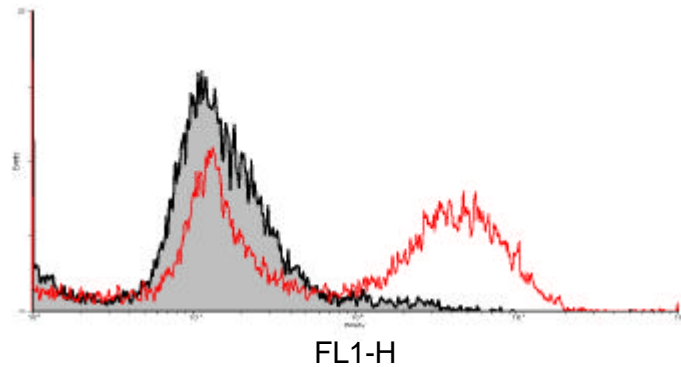
**Abbildung 4-2:**

**Überprüfung der Reinheit des gereinigten LT $\beta$ R:Ig** durch A)Coomassie Färbung und B)Western Blot. Auftrennung erfolgte unter reduzierenden Bedingungen. Beim Western Blot wurde als Erstantikörper 5G11b (1 $\mu$ g/ml) und als Sekundärantikörper (Ziege anti-Ratten IgG POX, 1 $\mu$ g/ml) verwendet. Spur 1-6 :Fraktionen 1-6 der Elution.

In den gereinigten Fraktionen wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Zusätzlich wurde der Gehalt an Fusionsprotein über den LT $\beta$ R:Ig-spezifischen ELISA (3.5.2) quantifiziert, die Proben aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 4.1.3 Bindungsfähigkeit an aktivierte T-Zellen *in vitro*

Um die Bindungsfähigkeit von LT $\beta$ R:Ig an die Liganden des LT $\beta$ R *in vitro* zu überprüfen, wurden PMMI Zellen mit PMA und Ionomycin für 16 h stimuliert. Es war bekannt, dass PMMI Zellen die Liganden LT $\alpha_1\beta_2$  und LIGHT unter diesen Inkubations-Bedingungen auf der Zelloberfläche exprimieren (Force, 1995). Die Bindungsfähigkeit von LT $\beta$ R:Ig an aktivierte PMMI erfolgte mittels Durchflußzytometrie. Dafür wurde das Fusionsprotein biotinyliert. Wie Abb. 4-3 zeigt bindet LT $\beta$ R:Ig spezifisch an PMA/Ionomycin aktivierte PMMI, wohingegen keine Bindung an unstimulierte PMMI erfolgt.



**Abbildung 4-3:**

**Bindung von LT $\beta$ R:Ig and aktivierte PMMI.** FACS Analyse von mit PMA/Ionomycin (je 10 $\mu$ g/ml) stimulierten PMMI. Als Erstantikörper wurde biotinyliertes LT $\beta$ R:Ig verwendet (10 $\mu$ g/ml), als Sekundärantikörper Streptavidin-FITC (10 $\mu$ g/ml)

— unstimulierte PMMI

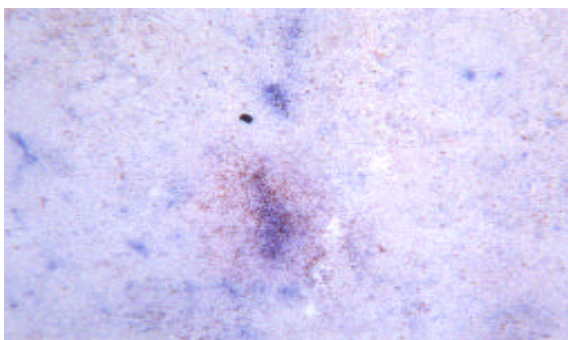
— PMA und Ionomycin (jeweils 10 $\mu$ g/ml)-stimulierte PMMI

#### 4.1.4 Biologische Aktivität

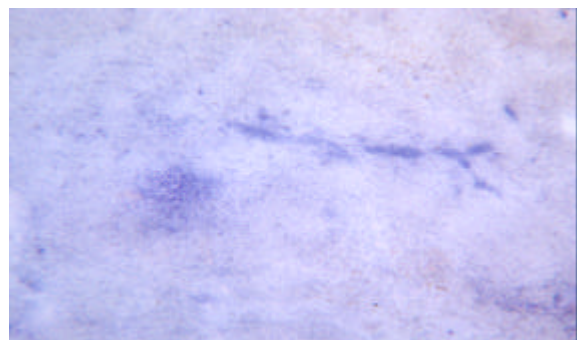
Die biologische Aktivität des LT $\beta$ R:Ig wurde in einem *in vivo* Experiment getestet:

Die Aktivierung des LT $\beta$ R auf Stromazellen spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung und beim Strukturerhalt von FDC. Hemmung der LT $\beta$ R-Aktivierung durch LT $\beta$ R:Ig-Gabe (100 $\mu$ g i.p., einmalig) in Mäusen zeigte, dass sich das bestehende FDC-Netzwerk der in der Milz zurückbildet (Koni, 1999; Mackay, 1998; Mabbott, 2000). In Abbildung 4-4 A ist eine typische Färbung von FDC-Strukturen in der Milz zu sehen. Hierbei sind die FDC rot gefärbt und befinden sich in enger Nachbarschaft zu Zentroblasten, die blau angefärbt sind. Im Gegensatz dazu kann man in der Milz von Mäusen die mit LT $\beta$ R:Ig behandelt wurden so gut wie kein FDC-Netzwerk mehr erkennen, Abb. 4-4 B.

**A**



**B**



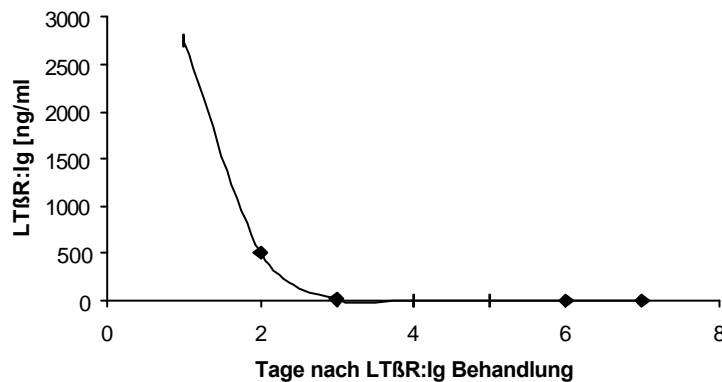
**Abbildung 4-4:**

**Test der biologischen Aktivität des LT $\beta$ R:Ig** anhand der Rückbildung des FDC-Netzwerks in der Milz. Mäuse erhielten einmalig 100 $\mu$ g LT $\beta$ R:Ig oder human IgG(neg Kontrolle) i.p.. Nach 3 Tagen wurde die Milz entnommen und das FDC Netzwerk angefärbt. A) Human IgG behandelt; B) LT $\beta$ R:Ig behandelt.

Dieses Experiment zeigt eindeutig, dass das verwendete LT $\beta$ R:Ig nicht nur in der Lage ist an die Liganden das LT $\beta$ R *in vitro* zu binden sondern auch *in vivo* die Aktivierung des LT $\beta$ R zu inhibieren.

### 4.1.5 Pharmakokinetik

Es wurde untersucht, wie lange LT $\beta$ R:Ig nach einmaliger Gabe i.p. im Serum von Mäusen nachweisbar war. Hierzu wurden 12 Mäusen jeweils 100 $\mu$ g LT $\beta$ R:Ig i.p. gespritzt. Daraufhin wurde jeden Tag zwei Mäusen Blut entnommen, daraus Serum gewonnen und mittels LT $\beta$ R:Ig-spezifischen ELISA auf das Vorhandensein von LT $\beta$ R:Ig untersucht. Wie Abbildung 4-5 zeigt, fällt die Serumkonzentration von LT $\beta$ R:Ig nach zwei Tagen rapide ab, war jedoch im ELISA bis zu vier Tage nach Behandlung noch nachweisbar (Tag 4: 3 pg/ml).



**Abbildung 4-5:**

**Pharmakokinetik des LT $\beta$ R:Ig.** 12 Mäusen wurde am Tag 0 100 $\mu$ g LT $\beta$ R:Ig i.p. gespritzt. Daraufhin wurde jeden Tag 2 Mäusen Blut entnommen, und dieses zur LT $\beta$ R:Ig-ELISA Untersuchung gepoolt.

Auf Grund der schnellen Abnahme von LT $\beta$ R:Ig im Blut der Mäuse wurde in späteren Versuchen das Fusionsprotein an fünf aufeinanderfolgenden Tagen jeweils täglich verabreicht, um ausreichend hohe Serumspiegel zu erhalten.



## **4.2 Hemmung der LT $\beta$ R-Aktivierung bei gesunden Mäusen**

Bevor der Effekt von LT $\beta$ R:Ig-Gabe bei Mäusen, die an einer akuten bzw. chronischen Colitis leiden, getestet wurde, wurde zuerst die Wirkung dieser Behandlung an gesunden Mäusen untersucht.

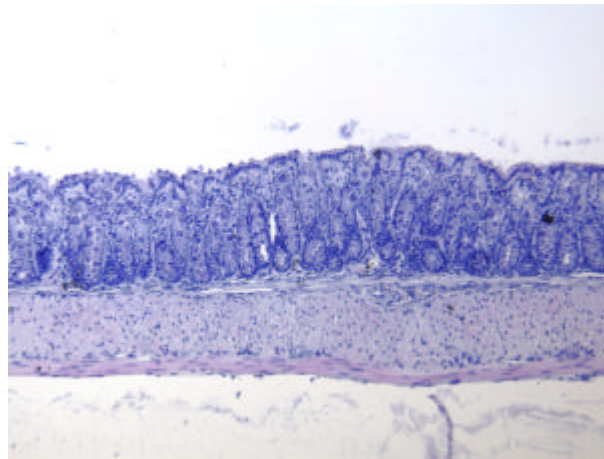
### **4.2.1 Einfluss auf die Entzündungsparameter des Dickdarms**

Es wurden weibliche BALB/c Mäuse mit einem Gewicht von 22-24g an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit LT $\beta$ R:Ig bzw. human IgG (jeweils 100 $\mu$ g, i.p.) behandelt. Am Tag nach der letzten Behandlung wurden die Tiere durch Genickbruch getötet und der Dickdarm entnommen, um die Entzündungsparameter zu bestimmen.

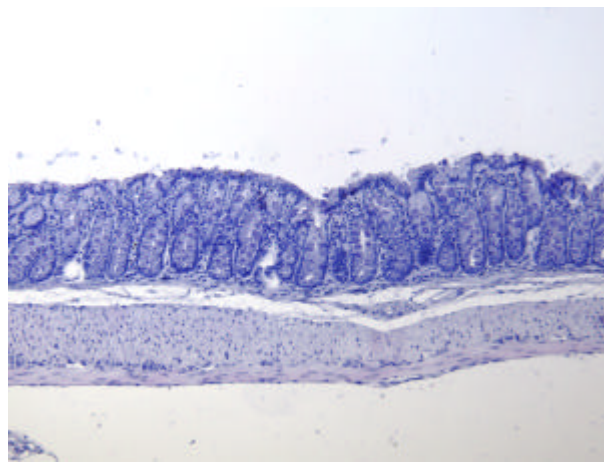
#### **4.2.1.1 Histologie und histologischer Score**

In der Histologie (Abb. 4-6 A) findet man keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die Krypten sind normal ausgeprägt, Becherzellen sind in normalem Umfang vorhanden und es ist kaum entzündliches Infiltrat feststellbar.

Hemmung der LT $\beta$ R Aktivierung in gesunden Mäusen führte zu einer leichten, aber nicht signifikanten, Verringerung des histologischen Scores (Abb. 4-6 A). Es muss hier auch beachtet werden, dass die gesunden Mäuse ein sehr geringes Niveau im histologischen Score zeigten, das messtechnisch kaum noch erniedrigt werden konnte.

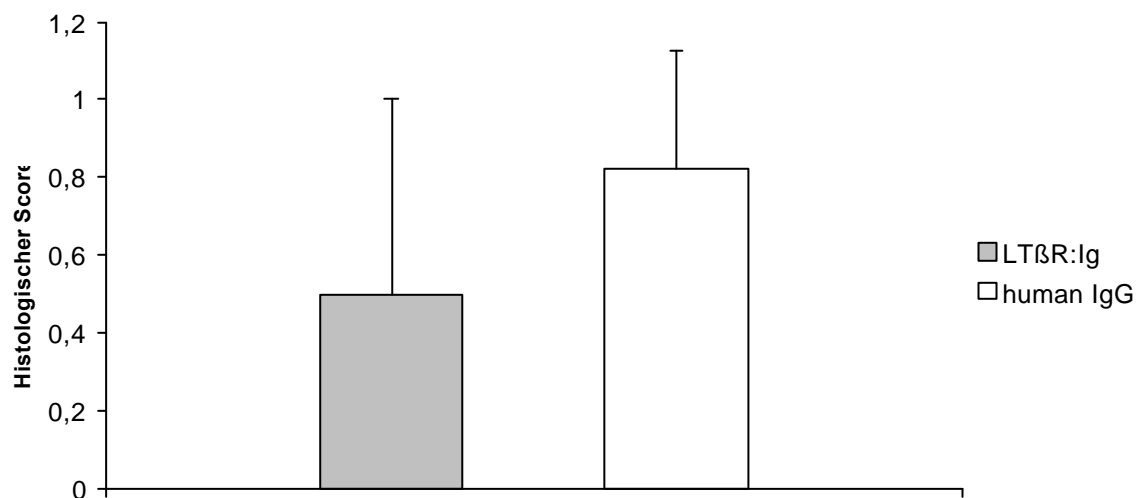


LT $\beta$ R:Ig



human IgG

**B**

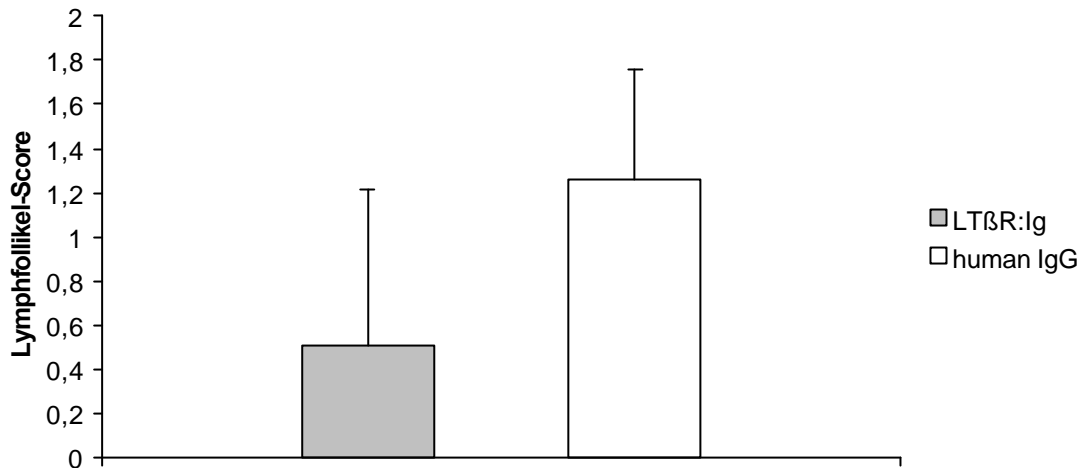


**Abbildung 4-6:**

**Histologie und histologischer Score.** A) Histologie der Dickdarmes (distaler Teil) von Mäusen(n=5), die an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit entweder LT $\beta$ R:Ig oder human IgG behandelt wurden. B) Histologischer Score der Mäuse aus A). Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

### 4.2.1.2 Lymphfollikel-Score

Blockade der LT $\beta$ R-Aktivierung durch LT $\beta$ R:Ig bei gesunden Mäusen führte zu einer Verringerung der Lymphfollikelanzahl im distalen Dickdarm im Vergleich zu human IgG behandelten Mäusen (Abb. 4-7). Diese Verringerung war jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 4-7:**

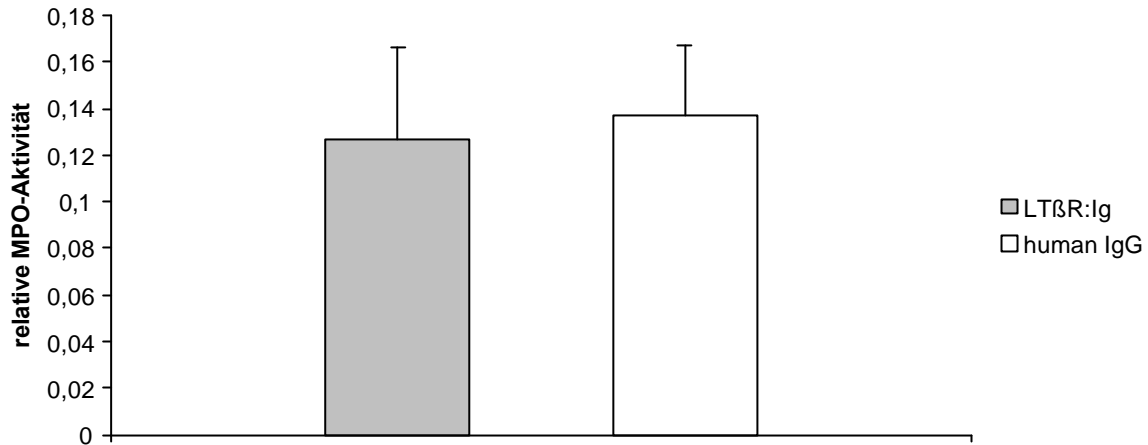
**Lymphfollikel-Score von gesunden Mäusen** (n=10), die an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit LT $\beta$ R:Ig bzw. human IgG behandelt wurden. Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

### 4.2.1.3 Gewichtsverlust

Bei der Behandlung von gesunden Mäusen mit LT $\beta$ R:Ig zeigt sich keine Veränderung des Gewichtes im Vergleich zu einer human IgG-Behandlung (nicht gezeigt). Auch absolut gesehen wurde keine Veränderung des Gewichtes der Mäuse durch die beiden Behandlungen festgestellt.

### 4.2.1.4 Myeloperoxidase-Aktivität

Als Maß für die Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Mukosa des Dickdarmes wurde die Myeloperoxidase-Aktivität der Biopsien bestimmt. Es wurde kein Unterschied in der MPO-Aktivität in Dickdarm-Biopsien von LT $\beta$ R:Ig- bzw. human IgG-behandelten Mäusen gefunden (Abb. 4-8).

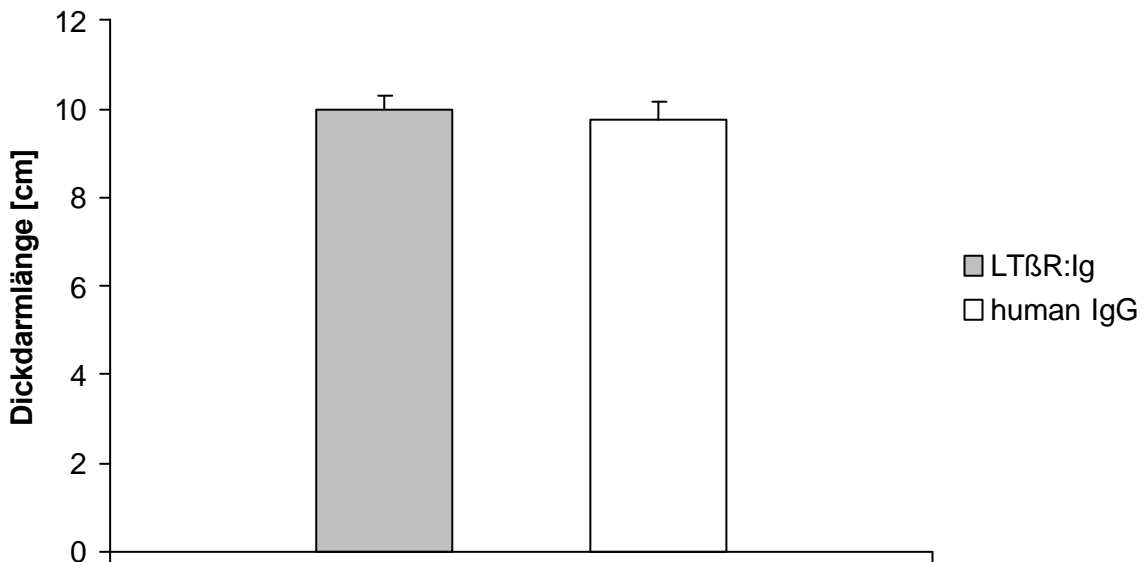


**Abbildung 4-8:**

**Relative MPO Aktivität** in Biopsien von LTβR:Ig bzw. human IgG behandelten Mäusen (n=5). Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

#### 4.2.1.5 Dickdarmlänge

Durch Behandlung von gesunden Mäusen mit LTβR:Ig war eine sehr geringe Zunahme der Dickdarmlänge im Vergleich zur human IgG-Behandlung festzustellen (10 cm im Vergleich zu 9,7), siehe Abb. 4-9.



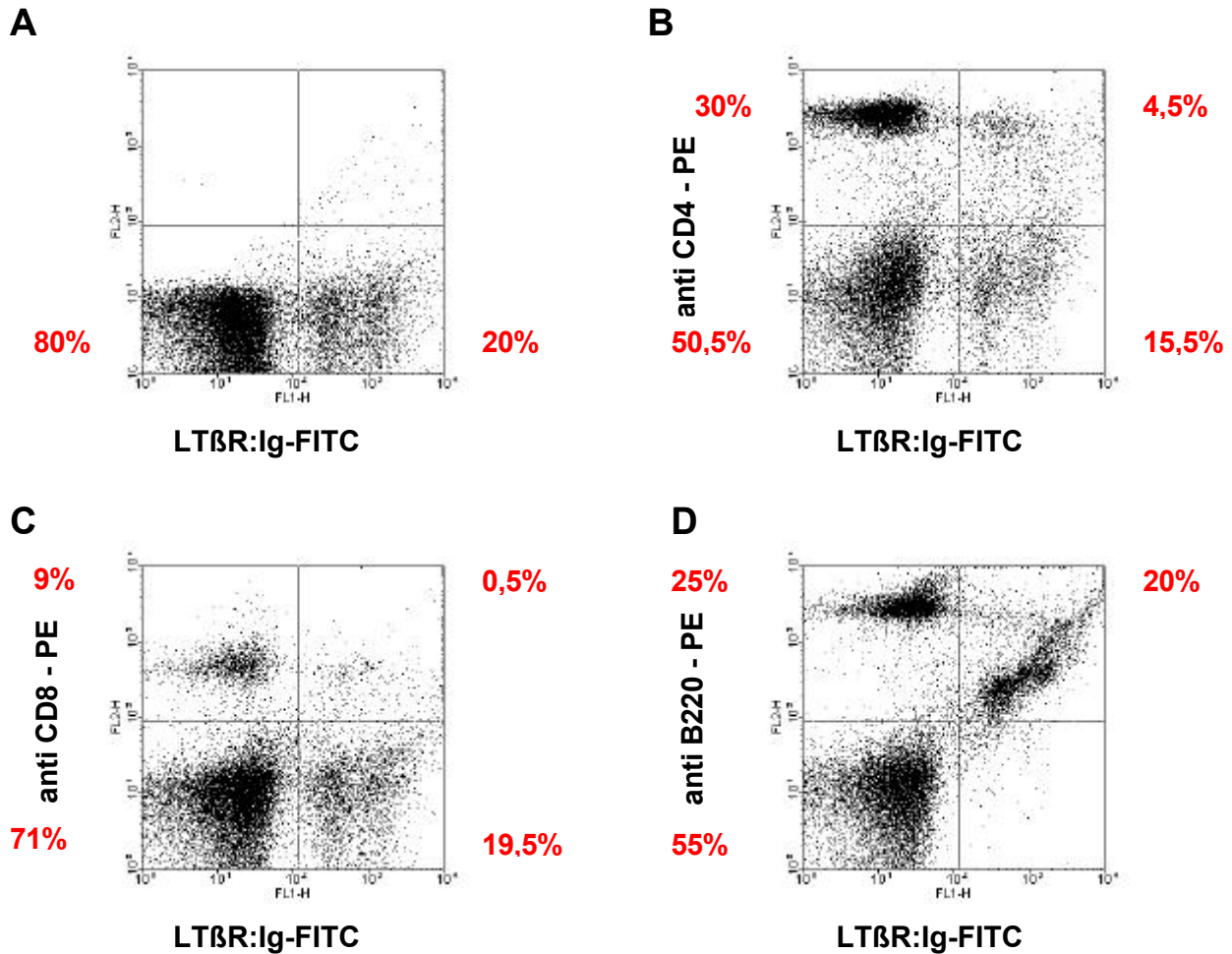
**Abbildung 4-9:**

**Dickdarmlängen** der LTβR:Ig bzw. human IgG behandelten Mäuse (n=10). Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass Gabe von LT $\beta$ R:Ig bei gesunden Mäusen die Basiswerte der Entzündungsparameter des Dickdarmes nur in geringem Maße beeinflusst. Nur der histologische Score und der Lymphfollikel-Score wurden jeweils durch LT $\beta$ R:Ig-Gabe leicht jedoch nicht signifikant verringert. Die anderen Parameter wie Gewichtsverlust, Dickdarmlänge und relative Myeloperoxidase-Aktivität wurden nicht beeinflusst.

### 4.2.2 LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT Expression von mesenterialen Lymphozyten

Um die Expression von LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT auf Lymphozyten, die aus mesenterialen Lymphknoten stammen, zu untersuchen, wurde Durchflußzytometrie mit einem FITC-markiertem LT $\beta$ R:Ig eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-10 A-D dargestellt, wobei Abb. 4-10 A zeigt, dass rund 20% aller Zellen aus den mesenterialen Lymphknoten die Liganden des LT $\beta$ R exprimieren. Hierbei war es sehr interessant zu beobachten, dass nur ein kleiner Teil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, nämlich 4,5% (Abb. 4-10 B), LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT positiv waren. Ebenfalls war nur ein verschwindend kleiner Teil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen positiv für die Expression von LT $\beta$ R-Liganden (0,3%, Abb. 4-10 C). Die weitaus größte LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT-Positivität zeigten B220/CD45R<sup>+</sup> Zellen, welche B-Zellen, die noch nicht zu Plasmazellen ausdifferenziert sind, darstellen (Abb. 4-10 D). Jedoch muss beachtet werden, dass anti-B220-PE mit T-Zellen kreuzreagiert. In 4-10 D zeigten alle Zellen die LT $\beta$ R:Ig-FITC positiv waren auch B220-Positivität. Daher muss aus diesem Gesamtkollektiv die Zahl der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die LT $\beta$ R:Ig-FITC positiv waren, subtrahiert werden, um die Menge an B220-positiven Zellen, die gleichzeitige LT $\beta$ R:Ig-FITC Anfärbung zeigen, zu ermitteln.



**Abbildung 4-10:**

**FACS von mesenterialen Lymphozyten auf LTα<sub>1</sub>β<sub>2</sub>/LIGHT Expression** mit A) LTβR:lg-FITC; B) LTβR:lg-FITC und anti CD4-PE; C) LTβR:lg-FITC und anti CD8-PE; und D) LTβR:lg-FITC und anti B220/CD45R-PE. Die mesenterialen Lymphozyten wurden von 5 verschiedenen Mäusen gepoolt und anschließend mittels Durchflußzytometrie analysiert. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

#### 4.2.3 Zytokinexpression von mesenterialen Lymphozyten

Aus jeder Gruppe (LTβR:lg und human IgG behandelt) wurden jeweils fünf Mäuse verwendet und die mesenterialen Lymphozyten herauspräpariert. Anschließend wurden sie für 24h in Medium kultiviert, die Überstände abgenommen und die Konzentration der Zytokine bestimmt. Dabei wurden pro Gruppe fünf Werte erhalten und daraus der Mittelwert gebildet. Bei den gesunden Mäusen wurde keine IL-4, MIP-2 bzw. TNF Produktion der mesenterialen Lymphozyten nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Wie Tab. 4-1 zeigt, ergibt sich durch die LTβR:lg-Behandlung bei der gesunden Maus ein nicht signifikanter Unterschied in der IL-6 Produktion.

	LT $\beta$ R:Ig		human IgG	
	Mittelwert [pg/ml]	SD	Mittelwert [pg/ml]	SD
<b>IL-6</b>	142	35	175	25

**Tabelle 4-1:**

**Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten aus LT $\beta$ R:Ig behandelten Mäusen.** Mäuse wurden entweder mit human IgG oder LT $\beta$ R:Ig behandelt und die mesenterialen Lymphknoten entnommen. Nach dem Herstellen einer Zellsuspension aus den mesenterialen Lymphozyten, wurden  $5 \times 10^6$  Lymphozyten/ml für 24 h inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand mittels ELISA auf die Konzentration von IL-6 untersucht. Die angegebenen Werte sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

### 4.3 Hemmung der LT $\beta$ R-Aktivierung bei Mäusen mit akuter DSS-induzierter Colitis

Um die Rolle der LT $\beta$ R Aktivierung in der akuten, durch DSS Gabe ausgelösten, Colitis zu erforschen, wurde das bereits beschriebene LT $\beta$ R:Ig-Fusionsprotein, durch das alle LT $\alpha_1\beta_2$  oder LIGHT vermittelten Funktionen unterbunden werden, benutzt.

#### 4.3.1 Einfluss auf Entzündungsparameter des Dickdarms

Mäuse wurden während der Induktion einer akuten Colitis von Tag 3-7 mit 100 $\mu$ g (5mg/kg Körpergewicht) LT $\beta$ R:Ig, human IgG oder anti-TNF-Antikörpern (V1q; Echtenacher, 1990) behandelt. In der akuten Phase der DSS-induzierten Colitis hat die Neutralisation von inflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF gezeigt, dass dies zu einer Verschlimmerung des Entzündungsgeschehens im Dickdarm führt (Kojouharoff, 1997). Es wurden in den folgenden Versuchen die möglichen Effekte einer LT $\beta$ R:Ig-Behandlung mit der einer anti-TNF-Behandlung verglichen.

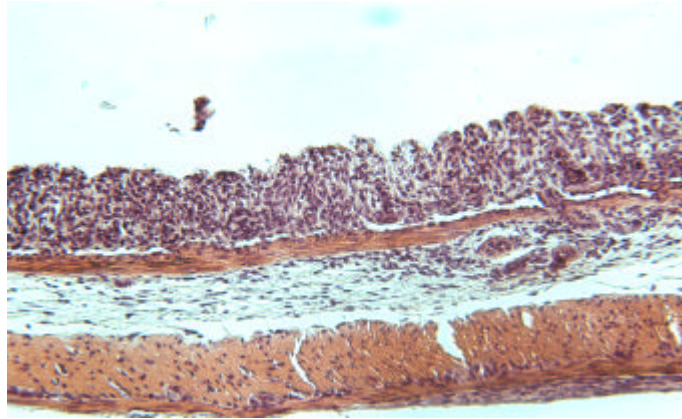
##### 4.3.1.1 Histologie und histologischer Score

Die charakteristischen Zeichen einer akuten intestinalen Entzündung, wie z.B. Krypten- und Becherzellverlust und neutrophiles Granulozyten-Infiltrat in die Mucosa wurden durch DSS Gabe in BALB/c Mäusen ausgelöst. Darmwände von human IgG-behandelten Mäusen mit akuter Colitis wiesen einen Verlust einzelner Krypten und Becherzellen und ein entzündliches Infiltrat, das bis in die Lamina muscularis mucosae reichte, auf (Abb. 4-11 A, unten). Die LT $\beta$ R:Ig-Behandlung von Mäusen mit akuter Colitis führte zu einer deutlichen Verschlechterung der Darmhistologie: Im distalen Bereich des Dickdarms war eine deutliche Zerstörung der Kryptenarchitektur mit einem flächigen Verlust von Krypten und Becherzellen,

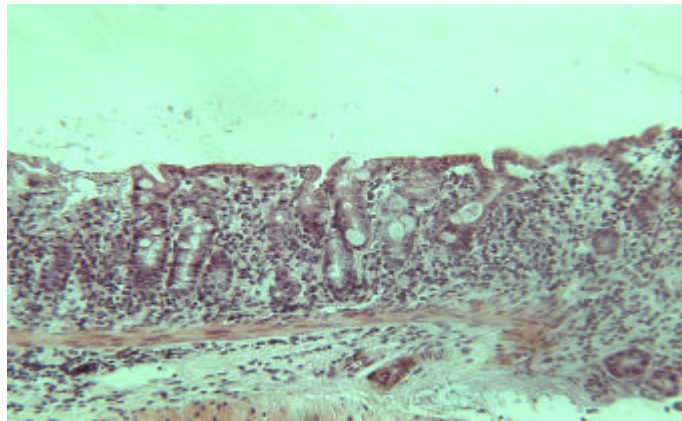
ein ausgedehntes entzündliches Infiltrat, das bis in die Submucosa reichte, und eine leichte Verdickung der Mucosa mit Oedemen zu sehen (Abb. 4-11 A, Mitte). Das entzündliche Infiltrat bestand zum größten Teil aus neutrophilen Granulozyten und in sehr geringem Maße aus Lymphozyten (Abb. 4-11 A, Mitte, oben). Die anti-TNF-Behandlung führte zu einer weiteren Verschlechterung der Darmhistologie: Hier war ein kompletter Verlust der Kryptenstruktur und von Becherzellen feststellbar. Ebenfalls zeigte sich hier ein großflächiges entzündliches Infiltrat, das bis in die Submucosa reichte (Abb. 4-11 A, oben). Diese Beobachtungen wurden durch den histologischen Score bestätigt: Die LT $\beta$ R:Ig-Behandlung von Mäusen mit akuter Colitis führte zu einer signifikanten Erhöhung des histologischen Scores (Abb. 4-11 B) im Vergleich zu human IgG-behandelten Mäusen. Hierbei waren auch die Einzel-Scores wie Epithelschaden und entzündliches Infiltrat signifikant erhöht (nicht gezeigt). Neutralisierung von TNF erhöhte ebenfalls den histologischen Score. Diese Erhöhung war sogar noch signifikanter als nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung. Auch bei der anti-TNF-Behandlung zeigten sich signifikant erhöhte Werte in den Einzel-Scores Epithelschaden und entzündliches Infiltrat im Vergleich zu human IgG-behandelten Mäusen mit akuter Colitis (nicht gezeigt).



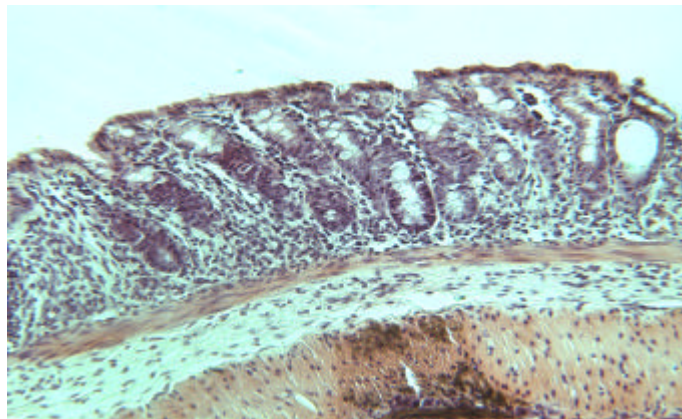
**A**



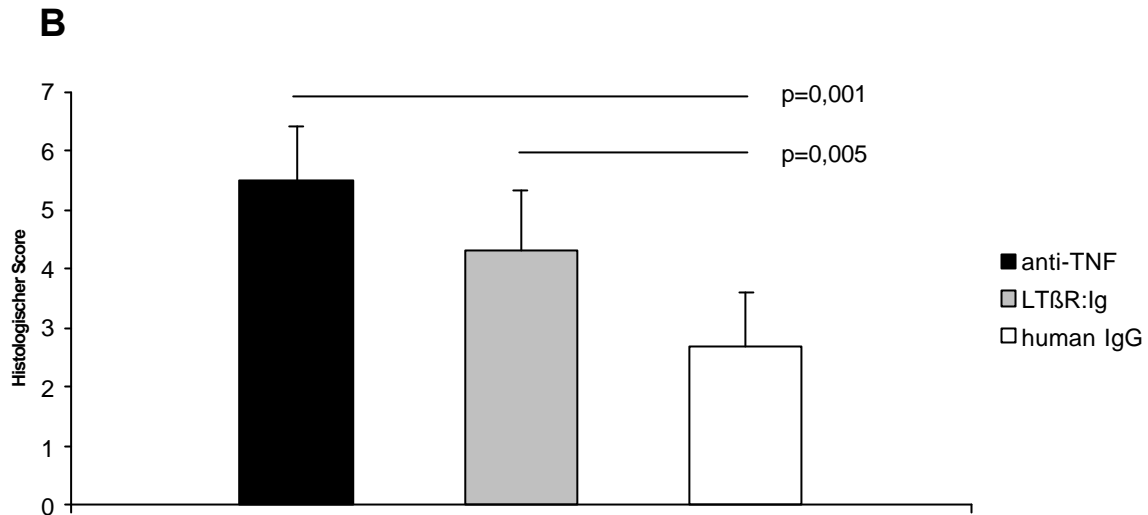
**anti-TNF**



**LT $\beta$ R:Ig**



**human IgG**

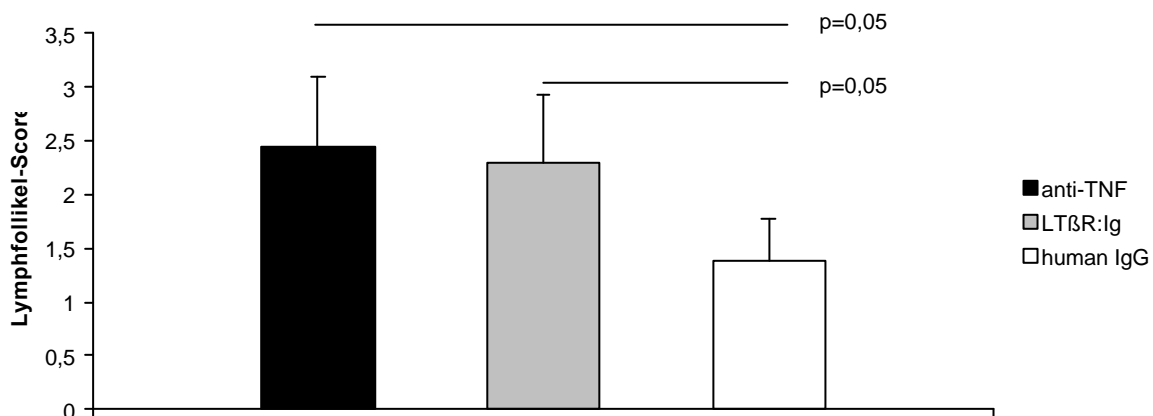


**Abbildung 4-11:**

**Effekt einer LTβR:Ig-Behandlung auf Histologie und den histologischen Score in der DSS-induzierten akuten Colitis.** A) Histologie der Dickdarmschnitte von Mäusen (n=8) mit akuter DSS-induzierter Colitis nach Behandlung mit anti-TNF, LTβR:Ig bzw. human IgG, nach Anfärbung mit Eosin-Hämatoxylin. B) Der histologische Score wurde im distalen Darmbereich von Mäusen, die wie in A) behandelt waren gemessen. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.3.1.2 Lymphfollikel-Score

LTβR:Ig-Behandlung in der akuten DSS-induzierten Colitis führte zu einer signifikanten (p=0,05) Erhöhung des Lymphfollikel-Scores im Vergleich zur human IgG-Gabe (Abb. 4-12). Durch Neutralisation von TNF wurde ebenfalls eine signifikante Erhöhung des Lymphfollikel-Scores gefunden (Abb. 4-12).

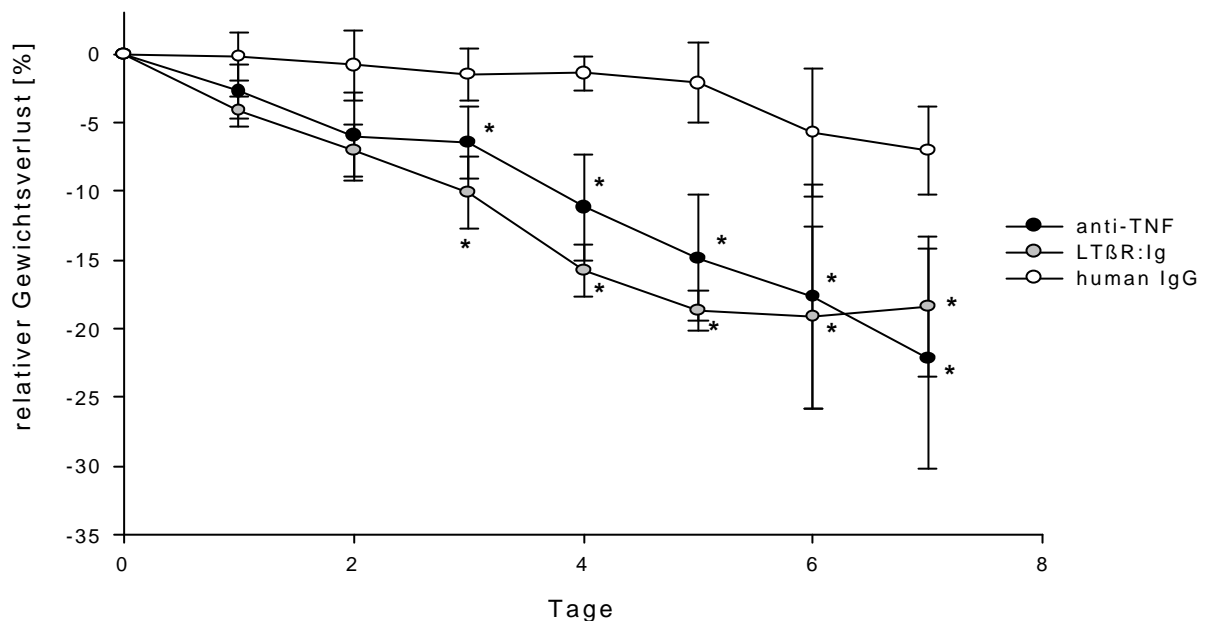


**Abbildung 4-12:**

**Lymphfollikel-Score von Mäusen mit akuter DSS-induzierter Colitis nach LTβR:Ig Behandlung.** Mäuse (n=8) wurden entweder mit anti-TNF, LTβR:Ig oder human IgG behandelt. Aufgetragen sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

### 4.3.1.3 Gewichtsverlust

Im Vergleich zu den Kontrollmäusen (human IgG behandelt) mit akuter Colitis war der Allgemeinzustand der LT $\beta$ R:Ig- bzw. anti-TNF-behandelten Mäuse mit akuter Colitis schlechter (struppigeres Fell, makroskopisch mehr Blut im Stuhl; nicht gezeigt). Außerdem konnte bereits vom dritten Tag an, nach Beginn der DSS-Behandlung ein signifikant höherer Gewichtsverlust der anti-TNF- und LT $\beta$ R:Ig-behandelten Mäuse mit akuter DSS-induzierter Colitis im Vergleich zu den mit human IgG behandelten Mäusen festgestellt werden (Abb. 4-13). Die Differenz im Gewichtsverlust zwischen den Gruppen nahm bis zum siebten Tag sogar noch zu und betrug am Ende des Experiments 15%.

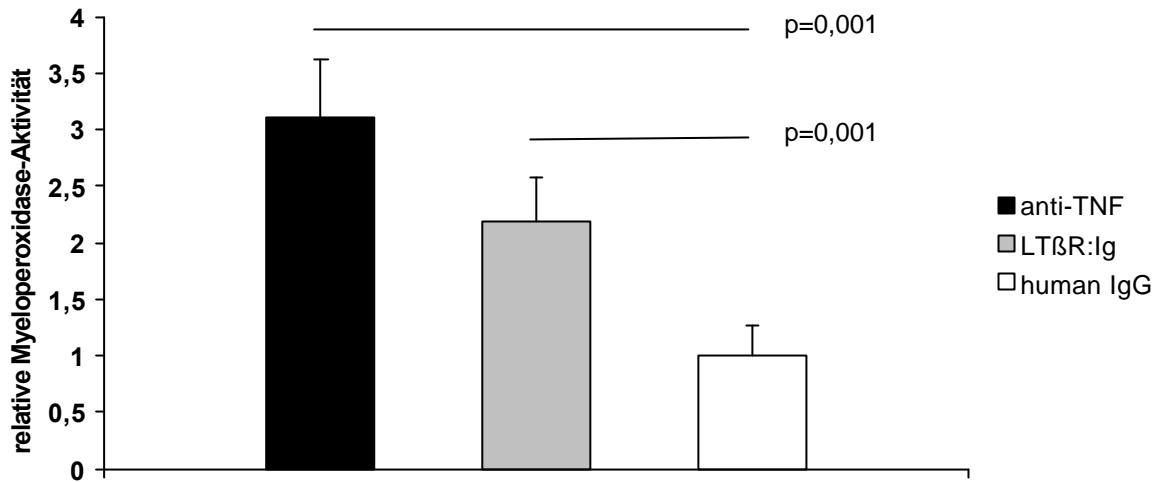


**Abbildung 4-13:**

**Effekt einer LT $\beta$ R:Ig-Behandlung auf den Gewichtsverlust während der DSS-induzierten akuten Colitis.** Der Gewichtsverlust; angegeben in % des ursprünglichen Gewichts, von Mäusen (n=8) wurde während der Induktion einer akuten DSS Colitis nach Behandlung mit anti-TNF, LT $\beta$ R:Ig bzw. human IgG gemessen. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* p<0,05

### 4.3.1.4 Myeloperoxidase-Aktivität

Die Behandlung von Mäusen mit akuter Colitis mit LT $\beta$ R:Ig resultierte in einer signifikant höheren MPO-Aktivität in Dickdarm-Biopsien im Vergleich zu Mäusen mit akuter Colitis, die human IgG erhielten (Abb. 4-14). Die Neutralisierung von TNF führte zu einer weiteren Erhöhung der MPO-Aktivität im Vergleich zu Mäusen, die mit human IgG behandelt wurden (Abb. 4-14).

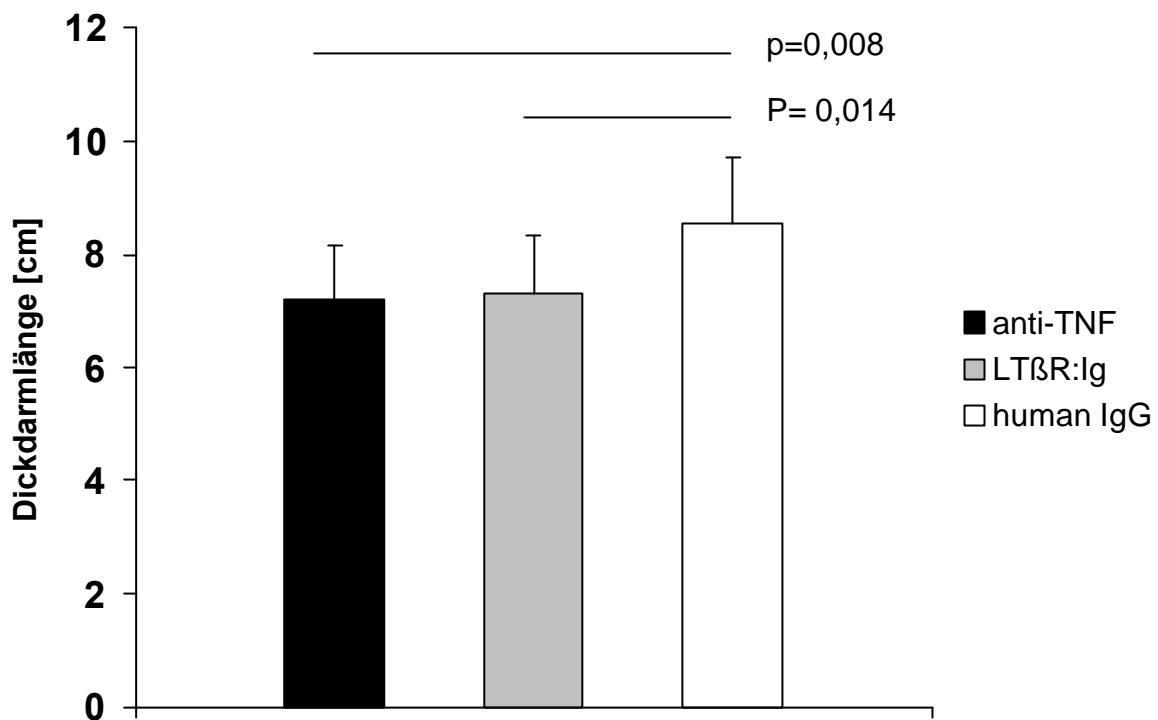


**Abbildung 4-14:**

**Relative Myeloperoxidase-Aktivität der LTβR:Ig behandelten Mäuse.** Die Aktivität der Myeloperoxidase in Dickdarmbiopsien von Mäusen, angegeben in relativer Einheit bezogen zur human IgG Behandlung, von Mäusen (n=8) wurde während der Induktion einer akuten DSS Colitis nach Behandlung mit anti-TNF, LTβR:Ig bzw. human IgG gemessen. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

#### 4.3.1.5 Dickdarmlänge

In der akuten DSS-induzierten Colitis führte eine Behandlung mit LTβR:Ig zu einer signifikanten Verkürzung des Dickdarmes verglichen mit einer human IgG-Behandlung (Abb. 4-15). Die Neutralisation von TNF führte im Vergleich dazu, zu einer minimal stärkeren Verkürzung der Dickdarmlänge (Abb. 4-15).

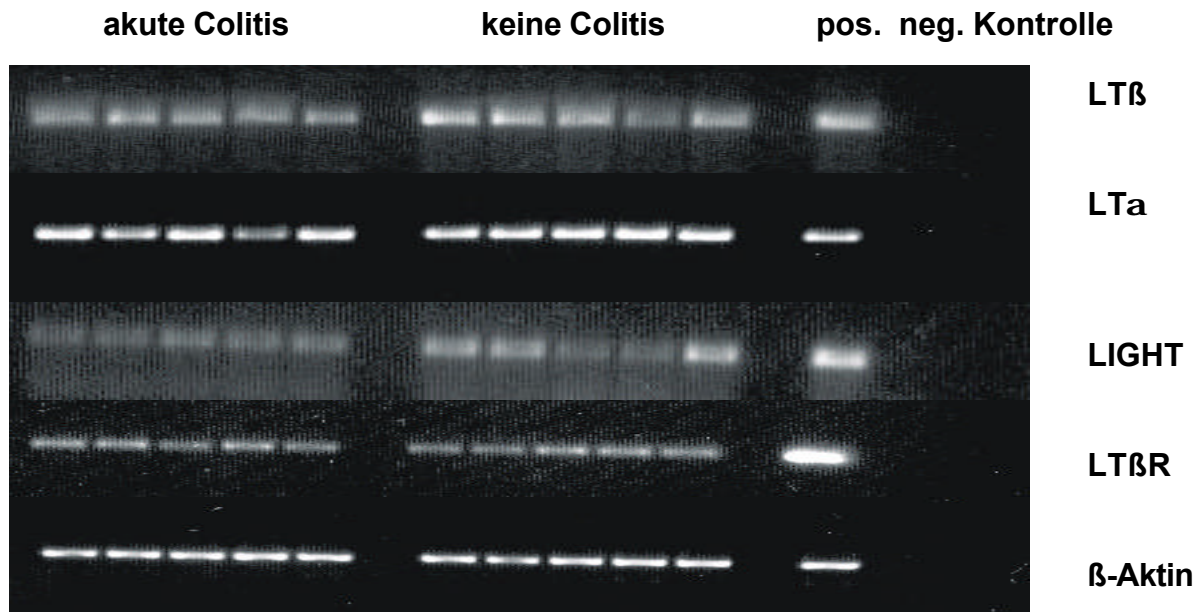


**Abbildung 4-15:**

**Dickdarmlängen der LTβR:Ig behandelten Mäuse mit akuter DSS-induzierter Colitis.** Die Dickdarmlängen, angegeben in cm, von Mäusen (n=8) wurde nach der Induktion einer akuten DSS Colitis nach Behandlung mit anti-TNF, LTβR:Ig bzw. human IgG gemessen. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

#### 4.3.2 LTβR/LT-Liganden Expression im Dickdarm

Die Expression von LTβR und seinen Liganden im Dickdarmgewebe in der akuten DSS-induzierten Colitis wurde durch semiquantitativen PCR analysiert. Hierfür wurden aus dem distalem Dickdarmbereich von Mäusen mit akuter Colitis bzw. von gesunden Mäusen Darmgewebe entnommen und daraus RNA isoliert. Daraufhin wurden gleiche Mengen an RNA mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben und in einer PCR-Analyse amplifiziert, durch Gelelektrophorese auf Agarosegelen aufgetrennt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und gemessen. Der Vergleich von RNA aus Dickdärmen von Mäusen mit akuter Colitis mit Colitis-freien Mäusen zeigte, dass weder die Expression des LTβR, noch die der Liganden LTα, LTβ bzw. LIGHT in signifikantem Maße messbar verändert war (Abb. 4-16).

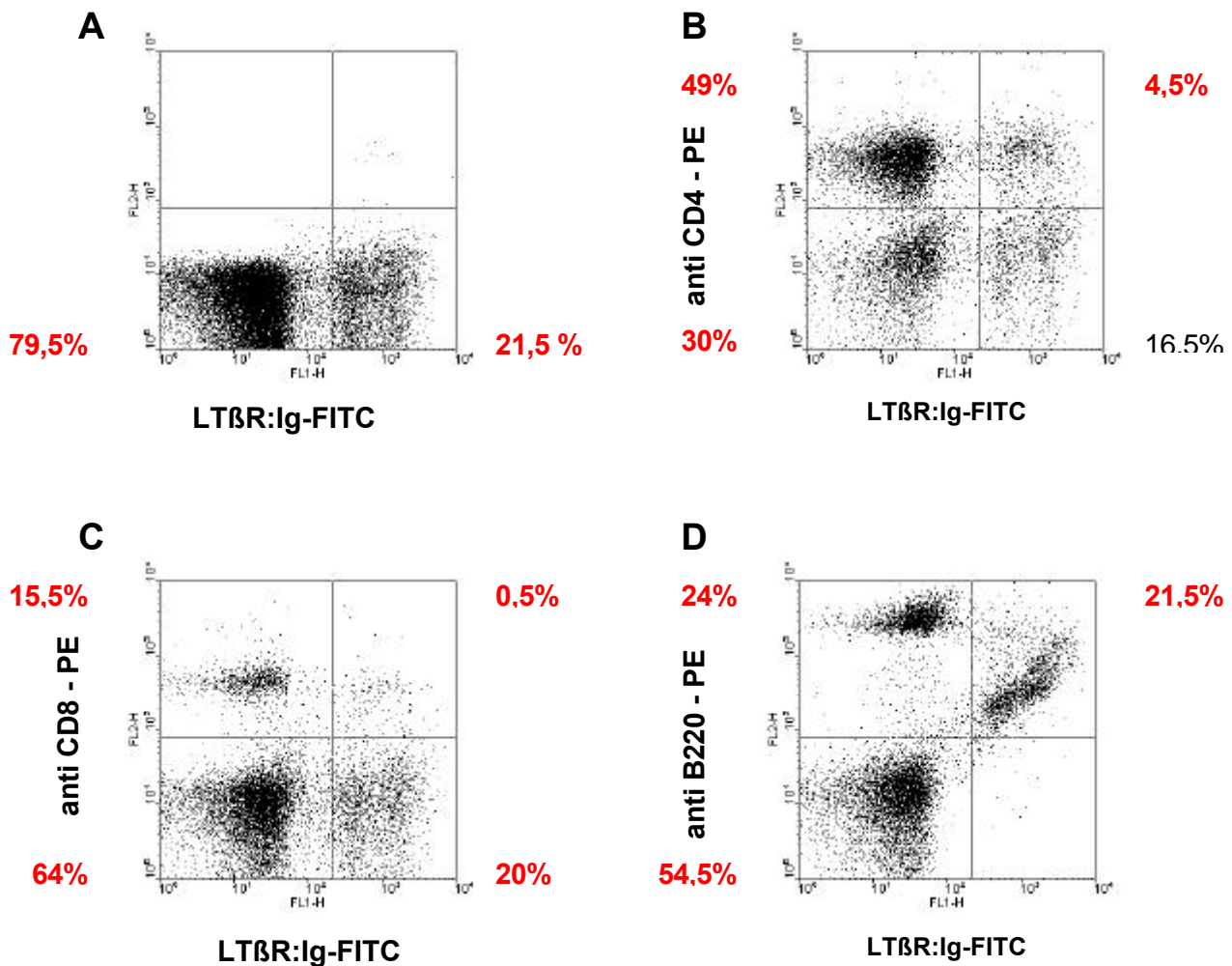


**Abbildung 4-16:**

**Semiquantitative PCR für LTβR/LT-Liganden**, aus Darmgewebe von gesunden Mäusen bzw. Mäusen mit akuter DSS-induzierter Colitis (n=5). Als positiv Kontrolle für LTβ, LTα und LIGHT diente mRNA aus PMMI Zellen, als positiv Kontrolle für LTβR diente mRNA aus BFS-1 Zellen. Negativ Kontrolle wurde bei jedem Experiment mit Wasser anstelle von cDNA durchgeführt. Die abgebildeten Banden sind repräsentativ für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### 4.3.3 LTα<sub>1</sub>β<sub>2</sub>/LIGHT Expression von mesenterialen Lymphozyten

Die Expression von LTα<sub>1</sub>β<sub>2</sub>/LIGHT auf Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten, die aus Mäusen mit einer DSS-induzierten akuten Colitis stammten, wurde untersucht. Dazu wurden mesenteriale Lymphozyten gewonnen und mit einem FITC-markiertem LTβR:Ig mittels Durchflußzytometrie analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-17 A-D dargestellt: Abb. 4-17 A, zeigt dass rund 21,5% aller Zellen aus den mesenterialen Lymphknoten von Mäusen mit akuter DSS-induzierten Colitis angefärbt wurden. Nur ein kleiner Teil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, nämlich 4,5% (Abb. 4-17 B), waren LTα<sub>1</sub>β<sub>2</sub>/LIGHT-positiv. Ebenfalls war nur ein verschwindend kleiner Teil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen positiv (0,5%, Abb. 4-17 C). Der weitaus größte Anteil an LTα<sub>1</sub>β<sub>2</sub>/LIGHT-Positivität zeigten die B220/CD45R<sup>+</sup> Zellen (Abb. 4-17 D). Auch hier ist, wie in 4.2.2, eine Kreuzreaktion von CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der B220<sup>+</sup>-Färbung zu beobachten. Dies entspricht genau den Färbeergebnissen bei gesunden Mäusen (Abb. 4-10).



**Abbildung 4-17:**

**FACS von mesenterialen Lymphozyten von Mäusen mit akuter DSS-induzierter Colitis auf LTα<sub>1</sub>β<sub>2</sub>/LIGHT Expression** mit A) LTβR:Ig-FITC; B) LTβR:Ig-FITC und anti CD4-PE; C) LTβR:Ig-FITC und anti CD8-PE; und D) LTβR:Ig-FITC und anti B220/CD45R-PE. Die mesenterialen Lymphozyten wurden von 5 verschiedenen Mäusen gepoolt und anschließend mittels Durchflußzytometrie analysiert. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

#### 4.3.4 Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Dickdarmgewebe

Um lokale Veränderungen der Zytokinproduktion im Dickdarm von Mäusen mit akuter DSS-induzierten Colitis durch LTβR:Ig-Gabe zu untersuchen, wurde die Methode der quantitativen PCR mittels Light Cycler benutzt. Hierzu wurde aus dem distalen Dickdarmabschnitten von Mäusen mit akuter Colitis, entweder LTβR:Ig- oder human IgG-behandelt, RNA isoliert. Anschließend wurde die mRNA Expression von IL-1β, IL-6 und TNF bestimmt, die als „Schlüsselzytokine“ bei Entzündungsreaktionen gelten. Die Behandlung mit LTβR:Ig in der akuten DSS-induzierten Colitis erhöhte die Transkription von allen drei untersuchten Zytokinen (Tabelle 4-2). Die Expression der mRNA für IL-6 war etwa 90-fach erhöht, die der

mRNA für TNF etwa 20-fach und die für IL-1 $\beta$  etwa 7-fach im Vergleich zu Mäusen, die mit human IgG behandelt wurden (Tabelle 4-2).

	LT $\beta$ R:Ig		human IgG	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	$4,03 \times 10^{-4}$	$2,6 \times 10^{-4}$	$5,37 \times 10^{-5}$	$3,1 \times 10^{-5}$
<b>IL-6</b>	$3,59 \times 10^{-2}$	$3,7 \times 10^{-2}$	$3,90 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-4}$
<b>TNF</b>	$1,34 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$6,51 \times 10^{-5}$	$6,2 \times 10^{-5}$

**Tabelle 4-2:**

**Quantitative PCR von mRNA aus Darmgewebe von Mäusen mit akuter DSS-inuzierter Colitis.** Angegebenen ist die mRNA Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF, aus Mäusen (n=5), die mit LT $\beta$ R:Ig bzw. human IgG behandelt wurden. mRNA Expression wurde mittels Light Cycler Technik quantifiziert. Angegebene Werte sind Mittelwerte von relativen Einheiten.

#### 4.3.5 Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten

Um die Auswirkungen einer LT $\beta$ R:Ig Behandlung auf die mesenterialen Lymphozyten zu untersuchen, wurde deren Fähigkeit zur Zytokinsekretion gemessen. Dazu wurden den Mäusen nach der Induktion der akuten Colitis durch DSS am Tag 8 die mesenterialen Lymphknoten entnommen und hieraus eine Zellsuspension hergestellt. Die Überstände der Zellkulturen wurden dann nach 24 h Inkubation auf die Konzentration von IL-6, TNF und MIP-2 untersucht. Im Zellkulturüberstand von den mesenterialen Lymphozyten aus LT $\beta$ R:Ig-behandelten Mäusen mit akuter DSS-induzierter Colitis war signifikant (p=0,03) mehr IL-6, TNF und MIP-2 messbar im Vergleich zu human IgG-behandelten Mäusen (Tabelle 4-3). Sowohl im Zellkulturüberstand von LT $\beta$ R:Ig- bzw. human IgG-behandelten Mäusen war kein IL-4 feststellbar (nicht gezeigt).

	LT $\beta$ R:Ig		human IgG	
	Mittelwert [pg/ml]	SD	Mittelwert [pg/ml]	SD
<b>IL-6</b>	93,8	44,1	17,5	10,6
<b>TNF</b>	133,8	15,9	53,8	30,05
<b>MIP-2</b>	702,5	31,8	137,5	10,6

**Tabelle 4-3:**

**Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten aus LT $\beta$ R:Ig behandelten Mäusen.** Am Tag 8 nach Induktion der akuten Colitis durch DSS wurden Mäusen, entweder human IgG oder LT $\beta$ R:Ig behandelt, die mesenterialen Lymphknoten entnommen und  $5 \times 10^6$  Lymphozyten/ml für 24 h inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand mittels ELISA auf die Konzentration von IL-6, TNF bzw. MIP-2 untersucht. Die angegebenen Werte sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.



## **4.4 Akute DSS-induzierte Colitis in LT $\beta$ R<sup>-/-</sup> Mäusen**

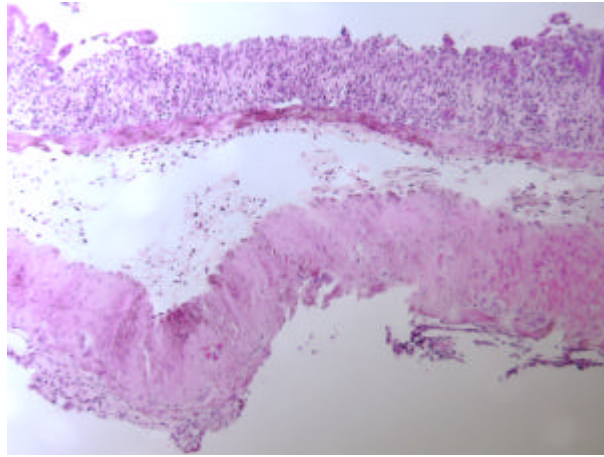
In den folgenden Experimenten wurden LT $\beta$ R<sup>-/-</sup> Mäuse mit Wildtyp (WT) Mäusen verglichen (beide Mauspopulationen haben genetisch den C57BL/6 Hintergrund). Bei den Versuchen mit C57BL/6 Mäusen konnte jedoch nur 2% DSS verwendet werden, da dieser Mausstamm viel empfindlicher auf DSS reagiert als BALB/c Mäuse.

### **4.4.1 Einfluss auf Entzündungsparameter des Dickdarms**

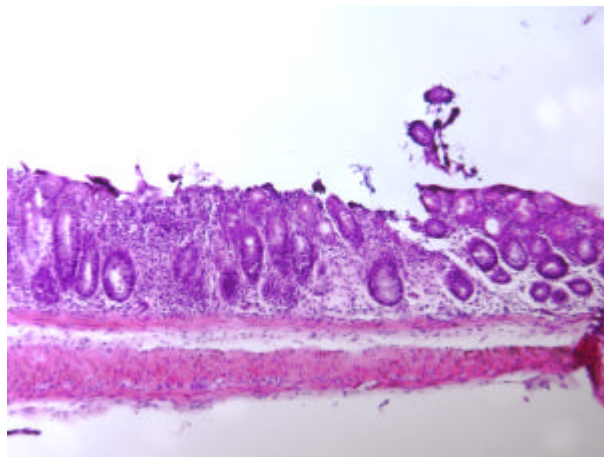
#### **4.4.1.1 Histologie und histologischer Score**

Auch in C57BL/6 Mäusen wurden die charakteristischen Zeichen einer akuten intestinalen Entzündung, wie z.B. Krypten- und Becherzellverlust und entzündliches Infiltrat von neutrophilen Granulozyten in die Mucosa durch DSS Gabe ausgelöst. Die Biopsien von WT Mäusen mit akuter DSS-induzierter Colitis wiesen einen Verlust von Krypten und Becherzellen und ein entzündliches Infiltrat, das bis in die Lamina muscularis mucosae reichte, auf (Abb. 4-18 A, unten). Die Induktion einer akuten Colitis in LT $\beta$ R<sup>-/-</sup> Mäusen führte zu einer deutlichen Verschlechterung der Darmhistologie. Im distalen Dickdarmbereich war eine vollständige Zerstörung der Kryptenarchitektur mit einem großflächigen Verlust von Krypten und Becherzellen, ein ausgedehntes entzündliches Infiltrat, das bis in die Submucosa reichte, und eine leichte Verdickung der Mucosa mit Oedemen zu sehen (Abb. 4-18 A, oben). Das entzündliche Infiltrat bestand zum größten Teil aus neutrophilen Granulozyten (Abb. 4-18 A). Diese Beobachtungen wurden durch den histologischen Score bestätigt: LT $\beta$ R<sup>-/-</sup> Mäuse mit akuter Colitis zeigten eine signifikante Erhöhung des histologischen Scores (Abb. 4-18 B) im Vergleich mit zu WT Mäusen.

**A**

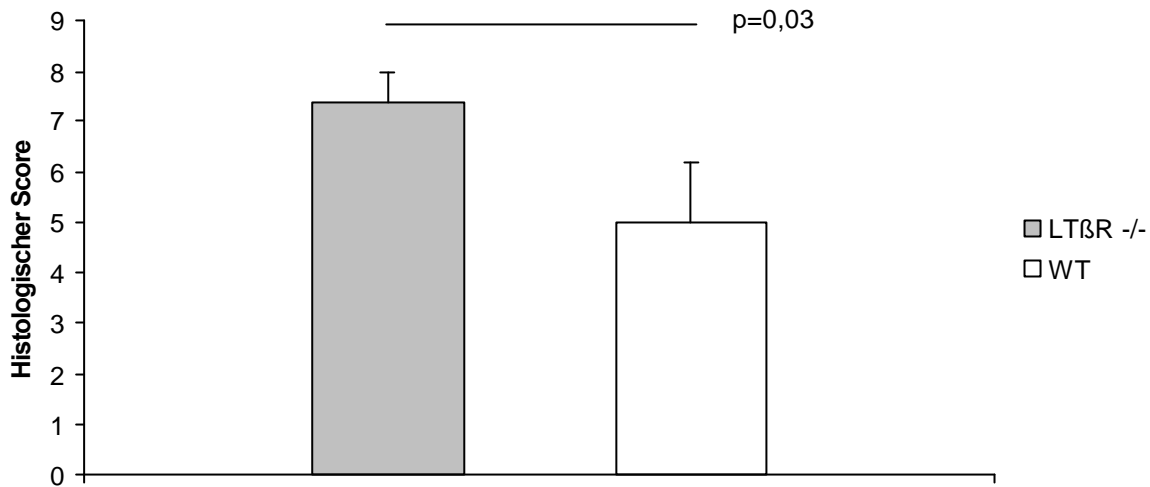


**$LT\beta R^{-/-}$**



**WT**

**B**

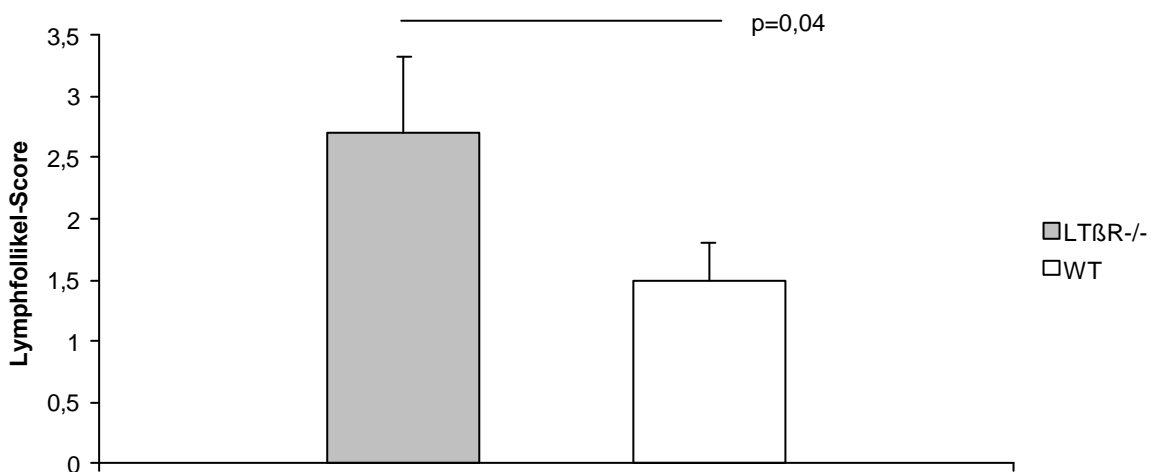


**Abbildung 4-18:**

**Effekt einer DSS-induzierten akuten Colitis auf die Histologie und den histologischen Score in LTβR<sup>-/-</sup> Mäusen.** A) Histologie der Dickdarmschnitte von Mäusen (n=5), entweder LTβR<sup>-/-</sup> oder WT, mit akuter DSS-induzierter Colitis nach Anfärbung mit Eosin-Hämatoxylin. B) Der histologische Score wurde im distalen Darmbereich von Mäusen wie in A). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

#### 4.4.1.2 Lymphfollikel-Score

Die Induktion einer akuten DSS-induzierten Colitis führte zu einer signifikanten (p=0,04) Erhöhung des Lymphfollikel-Scores in LTβR<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich WT Mäusen (Abb. 4-19).

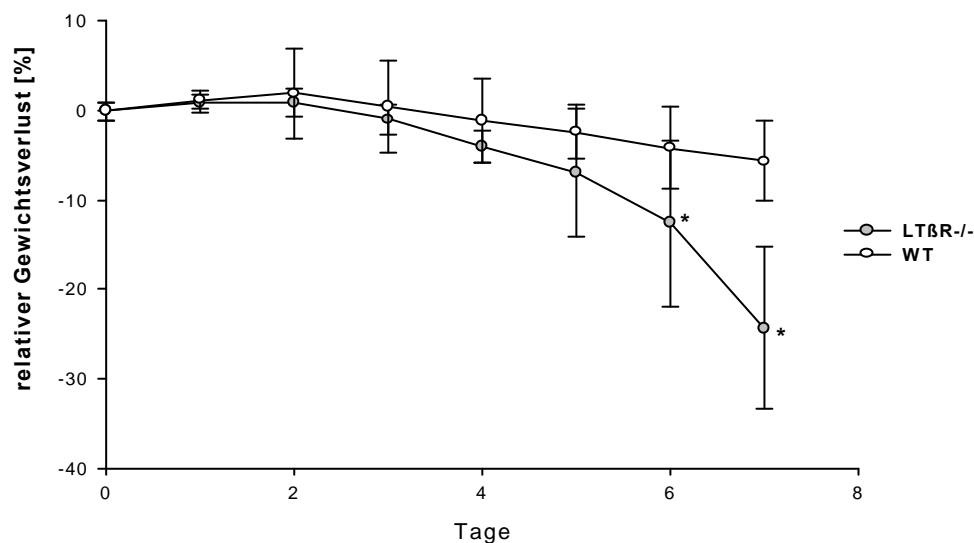


**Abbildung 4-19:**

**Lymphfollikel-Score von LTβR<sup>-/-</sup> Mäusen mit akuter DSS-induzierter Colitis.** Von Mäusen (n=5), entweder LTβR<sup>-/-</sup> oder WT, wurde der Lymphfollikel-Score von Dickdarmbiopsien bestimmt. Aufgetragen sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten

#### 4.4.1.3 Gewichtsverlust

Im Vergleich zu den Kontrollmäusen mit akuter DSS-induzierten Colitis war der Allgemeinzustand der  $LT\beta R^{-/-}$  Mäuse mit akuter Colitis weitaus schlechter (struppigeres Fell, makroskopisch mehr Blut im Stuhl; nicht gezeigt). Außerdem konnte am Tag sechs und sieben nach Beginn der DSS-Behandlung ein signifikant höherer Gewichtsverlust der  $LT\beta R^{-/-}$  Mäuse mit akuter DSS-induzierter Colitis im Vergleich zu den mit WT Mäusen festgestellt werden (Abb. 4-20). Die Differenz im Gewichtsverlust zwischen den Gruppen nahm am siebten Tag drastisch zu und betrug am Ende des Experiments 20%.

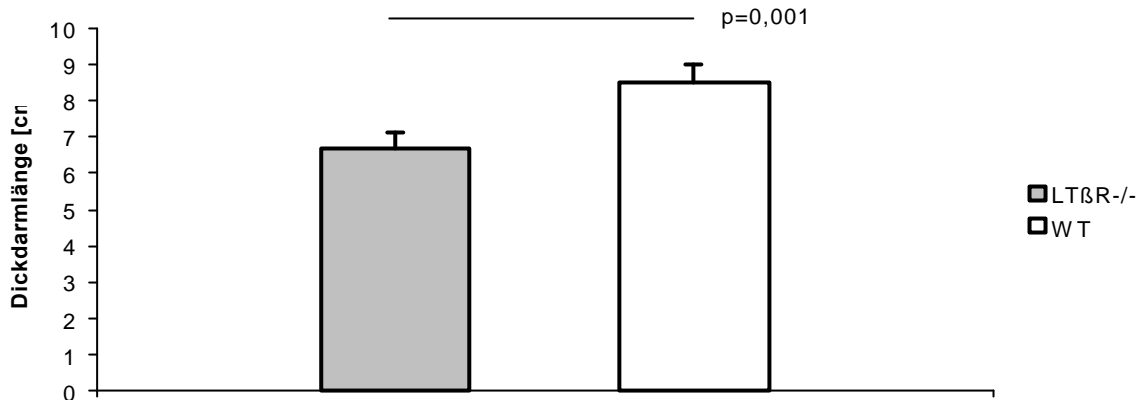


**Abbildung 4-20:**

**Gewichtsverlust von  $LT\beta R^{-/-}$  Mäusen während der DSS-induzierten akuten Colitis.** Der Gewichtsverlust; angegeben in % des ursprünglichen Gewichts, von Mäusen (n=5) wurde bei  $LT\beta R^{-/-}$  und WT Mäusen während der Induktion einer akuten DSS Colitis gemessen. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

### 4.4.1.4 Dickdarmlänge

Die Dickdarmlänge nach Induktion der akuten Colitis bei  $LT\beta R^{-/-}$  Mäusen führte zu einer signifikanten Verkürzung im Vergleich zur Dickdarmlänge von WT Mäusen (Abb. 4-21).



**Abbildung 4-21:**

**Dickdarmlängen von  $LT\beta R^{-/-}$  Mäusen mit akuter DSS Colitis.** Die Dickdarmlängen, angegeben in cm, von Mäusen (n=5), entweder  $LT\beta R^{-/-}$  oder WT, wurden nach Induktion einer akuten DSS Colitis gemessen. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

### 4.4.2 $LT\alpha_1\beta_2$ /LIGHT Expression von mesenterialen Lymphozyten

Die  $LT\alpha_1\beta_2$ /LIGHT Expression von mesenterialen Lymphozyten aus  $LT\beta R^{-/-}$  Mäusen konnte nicht untersucht werden, da  $LT\beta R^{-/-}$  Mäuse keine mesenterialen Lymphknoten besitzen.

### 4.4.3 Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Dickdarmgewebe

Die Methode der quantitativen PCR mittels LIGHT Cycler wurde benutzt, um lokale Veränderungen der Zytokinproduktion im Dickdarm von Mäusen mit akuter DSS-induzierten Colitis zu untersuchen. Hierzu wurde aus den distalen Dickdarmabschnitten von Mäusen mit akuter Colitis, entweder  $LT\beta R^{-/-}$  oder WT, RNA isoliert und die mRNA Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF bestimmt. In der akuten Colitis bei  $LT\beta R^{-/-}$  Mäusen erhöhte sich die Transkription von IL-6 im Vergleich zu WT Mäusen dramatisch (Tabelle 4-4). Interessanterweise war die Expression der mRNA IL-1 $\beta$  in beiden Mausgruppen fast gleich. Die Menge an mRNA für TNF war erstaunlicher Weise in WT Mäusen erhöht, im Vergleich zu den  $LT\beta R^{-/-}$  Mäusen. Da TNF normaler Weise die Produktion von IL-6 induziert ist dieses Ergebnis umso erstaunlicher. Die angegebenen Werte sind jedoch statistisch nicht signifikant, da die Unterschiede zwischen den Tieren innerhalb einer Gruppe zu groß waren. Die angegebenen Werte können daher nur als Trend angesehen werden.

	LT $\beta$ R <sup>-/-</sup>		WT	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	4,3x10 <sup>-3</sup>	1,3x10 <sup>-3</sup>	5,7x10 <sup>-3</sup>	5,1x10 <sup>-3</sup>
<b>IL-6</b>	5,3x10 <sup>-3</sup>	5,3x10 <sup>-3</sup>	1,8x10 <sup>-4</sup>	3,8x10 <sup>-4</sup>
<b>TNF</b>	2,0x10 <sup>-3</sup>	1,7x10 <sup>-3</sup>	1,9x10 <sup>-2</sup>	3,2x10 <sup>-2</sup>

**Tabelle 4-4:**

**Quantitative PCR von mRNA aus Darmgewebe** von Mäusen (n=5) mit akuter DSS-induzierter Colitis. Angegeben ist die mRNA Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF, aus Mäusen, LT $\beta$ R<sup>-/-</sup> oder WT, die mittels Light Cycler Technik quantifiziert wurde. Angegebene Werte sind Mittelwerte von relativen Einheiten.

#### **4.4.4 Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten aus LT $\beta$ R<sup>-/-</sup> Mäusen**

Die Bestimmung der Zytokinsekretion aus mesenterialen Lymphknoten bei LT $\beta$ R<sup>-/-</sup> Mäusen konnte nicht durchgeführt werden, da diese Mäuse keine mesenterialen Lymphknoten besitzen.

## **4.5 Hemmung der LT $\beta$ R-Aktivierung bei Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis**

Um die Hemmung der LT $\beta$ R-Aktivierung in der chronischen DSS-induzierten Colitis zu untersuchen, wurde wiederum das bereits beschriebene LT $\beta$ R:Ig-Fusionsprotein benutzt.

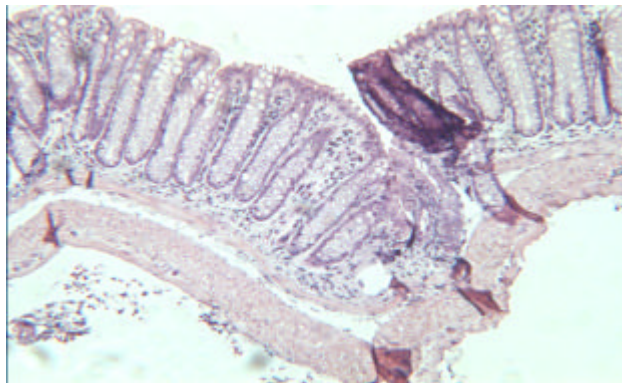
### **4.5.1 Einfluss auf Entzündungsparameter des Dickdarms**

Mäuse wurden 14-21 Tage nach der Induktion einer chronischen Colitis an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 100 $\mu$ g i.p. (5mg/kg Körpergewicht) LT $\beta$ R:Ig, human IgG oder anti-TNF-Antikörpern behandelt. In der chronischen Phase der DSS-induzierten Colitis hat die Neutralisation von inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. TNF, gezeigt, dass dies zu einer Verminderung der Entzündung im Dickdarm führt (Kojouharoff, 1997). In den folgenden Versuchen wurden die möglichen Effekte einer LT $\beta$ R:Ig-Behandlung mit der einer anti-TNF-Behandlung verglichen.

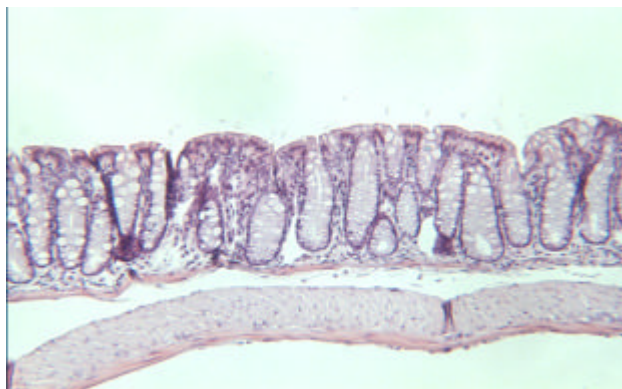
#### **4.5.1.1 Histologie und histologischer Score**

Etwa 2-3 Wochen nach Beendigung des letzten DSS-Zyklus zeigte sich bei den Mäusen folgendes Bild: etwa 70 % der Mäuse hatten einen weichen Stuhl und 30% der Mäuse hatten Diarrhö. Es war makroskopisch kein Blut im Stuhl feststellbar (nicht gezeigt). Histologisch war bei allen Mäusen eine chronische Colitis feststellbar, mit Verlust von Becherzellen und Krypten und entzündlichem Infiltrat, das vor allem aus Lymphozyten bestand, feststellbar. Nach Kontroll-Behandlung der Mäuse mit human IgG zeigte sich in der Histologie ein flächenhaft auftretender Verlust von Becherzellen und Krypten. Darüber hinaus waren auch Ulcerationen in der Mukosa zu beobachten. Ebenfalls war ein starkes Maß an entzündlichem Infiltrat in der Mukosa feststellbar (Abb. 4-22 A, unten). In der chronischen Form der DSS-induzierten Colitis zeigte sich die Epithelschicht des Darms weniger angegriffen. Sowohl die LT $\beta$ R:Ig- als auch anti-TNF-behandelten Gruppen zeigten eine, verglichen zur human IgG-behandelten Gruppe, signifikant verbesserte Histologie. Dies spiegelte sich in einer regenerierten Becherzell- und Kriptenarchitektur wieder. Auch das Ausmaß des entzündlichen Infiltrates war in den LT $\beta$ R:Ig- bzw. anti-TNF-behandelten Mäusen weniger stark ausgeprägt als in den Kontrollmäusen (Abb. 4-22, A oben, Mitte). Diese Beobachtungen wurden durch den histologischen Score bestätigt: Die LT $\beta$ R:Ig- bzw. anti-TNF-Behandlung von Mäusen mit chronischer Colitis führte zu einer signifikanten Verminderung des histologischen Scores (Abb. 4-22 B) im Vergleich zu human IgG-behandelten Mäusen. Hierbei war der Einzel-Score entzündliches Infiltrat signifikant erniedrigt. (nicht gezeigt).

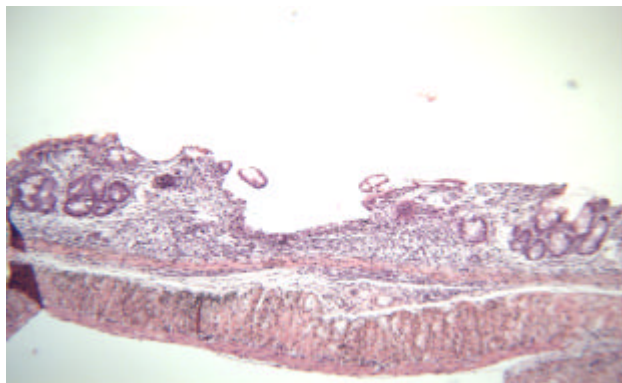
**A**



**anti-TNF**

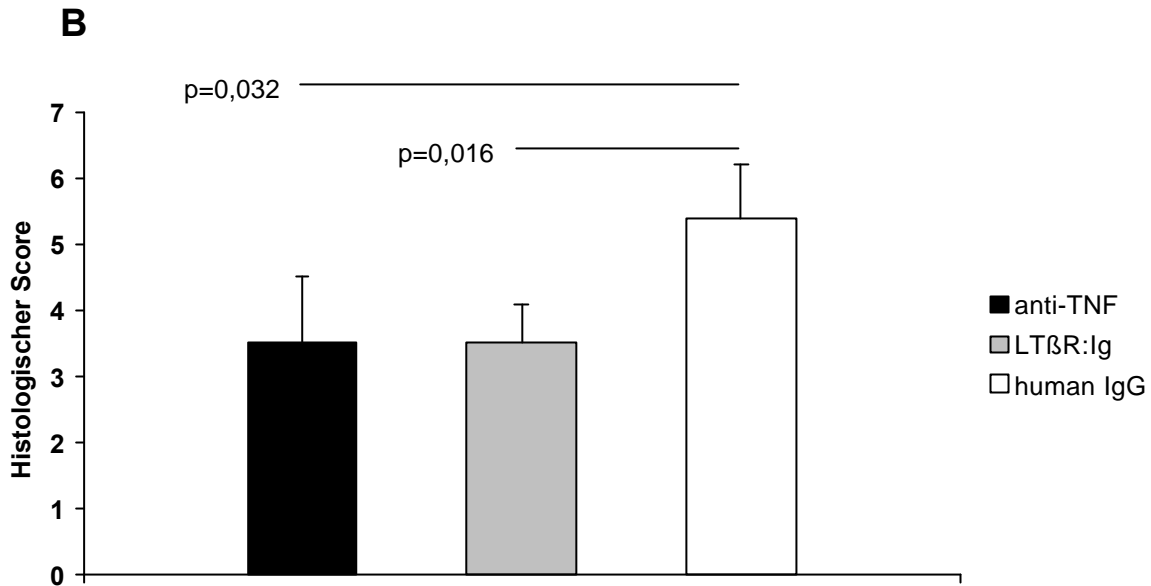


**LTβR:Ig**



**human IgG**



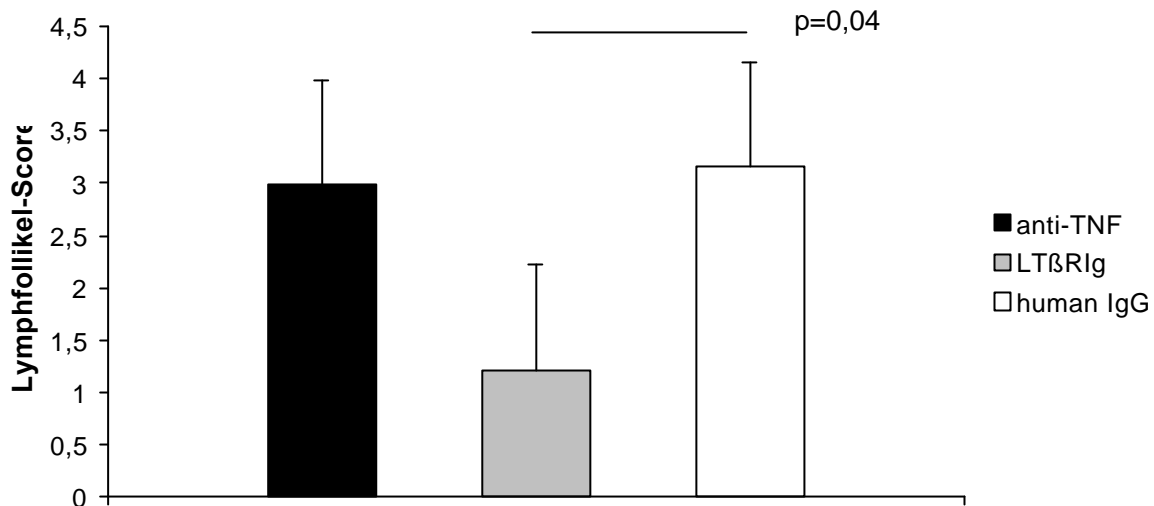


**Abbildung 4-22:**

**Effekt einer LTβR:Ig-Behandlung auf die Histologie und den histologischen Score bei Mäusen mit DSS-induzierten chronischen Colitis.** A) Histologie der Dickdarmschnitte von Mäusen (n=6), entweder anti-TNF, LTβR:Ig oder human IgG behandelt, nach Anfärbung mit Eosin-Hämatoxylin. B) Der histologische Score wurde im distalen Darmbereich von den Mäusen aus A) gemessen. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

#### 4.5.1.2 Lymphfollikel-Score

Neutralisation von TNF verringert weder die Größe noch die Anzahl an „colonic patches“ verglichen mit der human IgG-Gabe in der chronischen Form der Colitis (Abb. 4-23). Demgegenüber reduziert die Behandlung mit LTβR:Ig während der chronischen Colitis signifikant den Lymphfollikel-Score (Abb. 4-23), was sich histologisch in einer geringeren Anzahl und Größe von „colonic patches“ manifestiert (nicht gezeigt).



**Abbildung 4-23:**

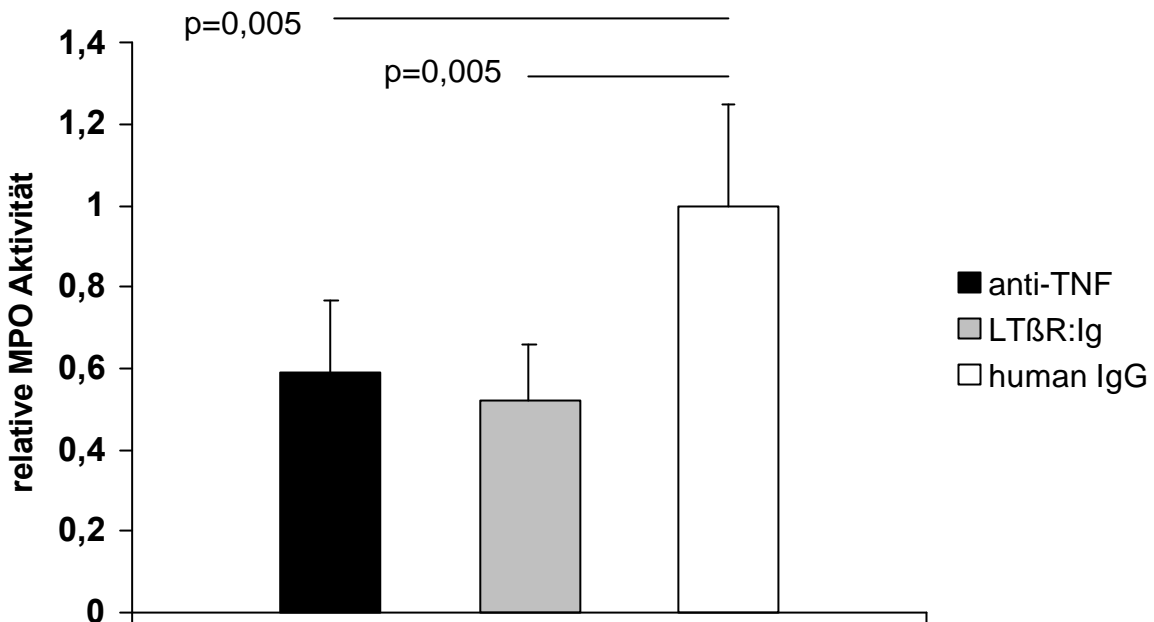
**Lymphfollikel-Score von Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis.** Die Mäuse (n=6) wurden entweder mit anti-TNF, LTβRIg oder human IgG behandelt. Aufgetragen sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

#### 4.5.1.3 Gewichtsverlust

Bei der chronischen DSS-induzierten Colitis kann auf Grund des kurzen Behandlungsschemas und der weitaus geringeren Diarrhö, als bei der akuten Colitis, keine Gewichtsveränderung gemessen werden (nicht gezeigt).

#### 4.5.1.4 Myeloperoxidase-Aktivität

Abb. 4-24 zeigt, dass eine Behandlung sowohl mit anti-TNF als auch mit LTβRIg die MPO-Aktivität im distalen Dickdarmbereich von Mäusen mit chronischer Colitis signifikant verringert, verglichen zur human IgG-Behandlung. Jedoch ist zu bemerken, dass es sich hierbei um relative Werte der MPO handelt, die absoluten Werte der MPO-Aktivität in der chronischen Colitis sind weitaus geringer als in der akuten Phase der Colitis (nicht gezeigt).

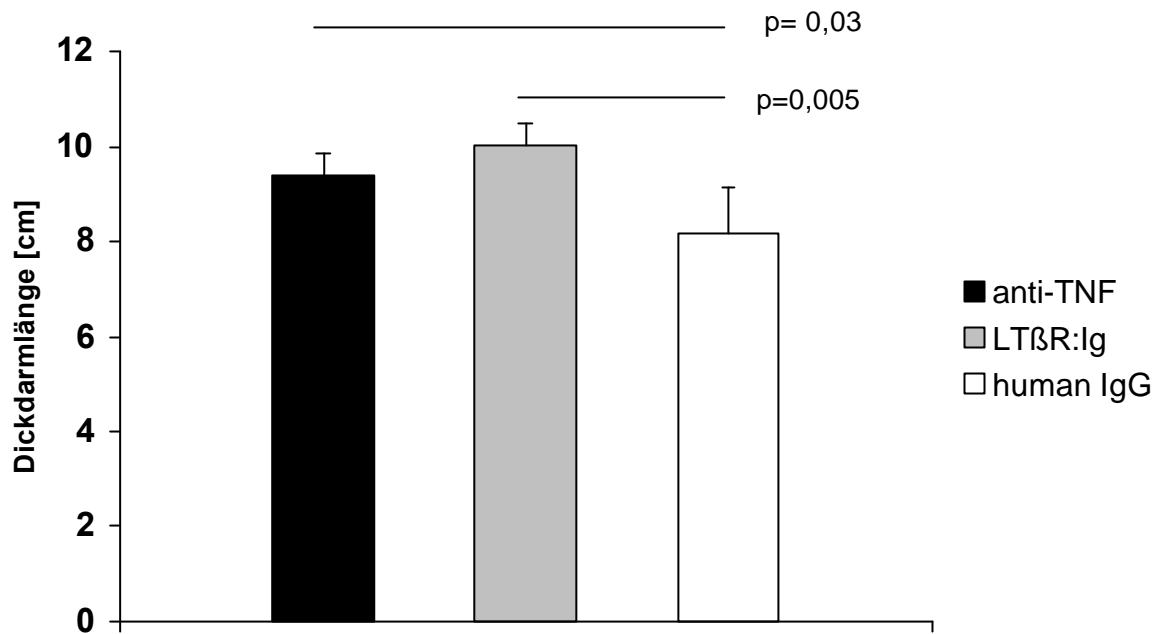


**Abbildung 4-24:**

**Relative Myeloperoxidase-Aktivität der LTβR:Ig behandelten Mäuse mit chronischer DSS-induzierter Colitis.** Die Aktivität der Myeloperoxidase, angegeben in relativer Einheit bezogen zur human IgG Behandlung, von Mäusen (n=6) wurde nach der Induktion einer chronischen DSS Colitis nach Behandlung mit anti-TNF, LTβR:Ig bzw. human IgG gemessen. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

#### 4.5.1.5 Dickdarmlänge

Es zeigt sich nach LTβR:Ig-Behandlung eine signifikant erhöhte Dickdarmlänge von Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis verglichen mit Dickdärmen von Mäusen nach human IgG-Behandlung (Abb. 4-25). Auch in Mäusen, die eine anti-TNF-Behandlung erhalten haben, zeigte sich eine signifikante Verlängerung des Dickdarmes (Ab 4-25).

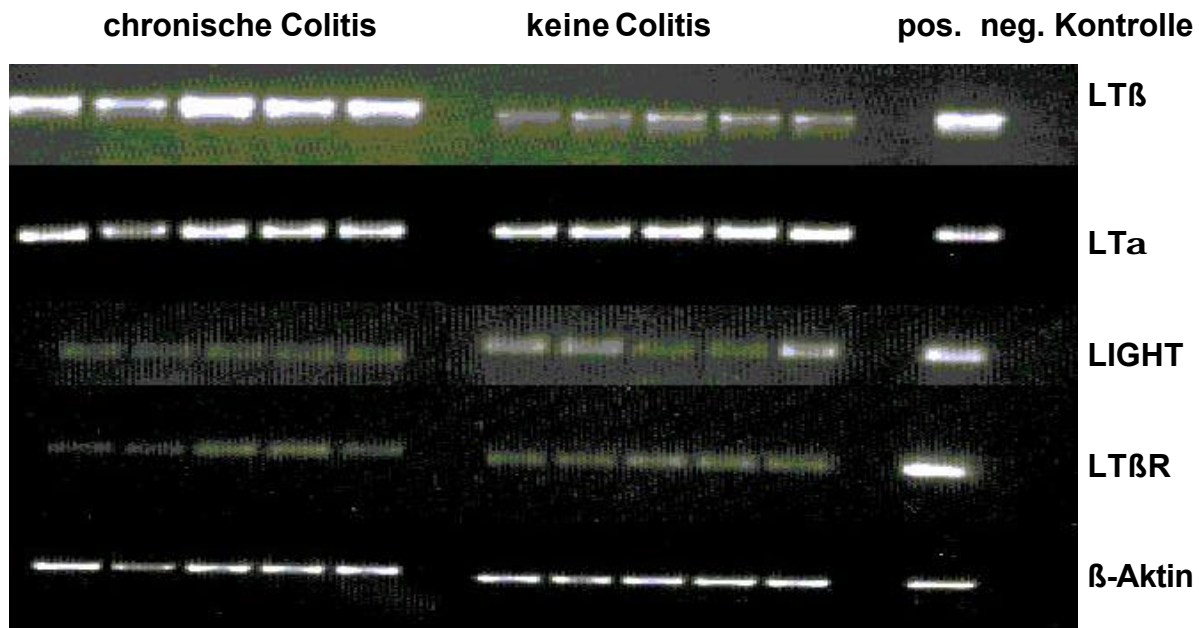


**Abbildung 4-25:**

**Dickdarmlängen der LTβR:Ig behandelten Mäuse mit chronischer DSS-induzierter Colitis.** Die Dickdarmlänge, angegeben in cm, von Mäusen (n=6) wurde nach der Induktion einer chronischen DSS-induzierten Colitis nach Behandlung mit anti-TNF, LTβR:Ig bzw. human IgG gemessen. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

#### 4.5.2 LTβR/LT-Liganden Expression im Dickdarm

Um die Regelung der Expression von LTβR und dessen Liganden in der chronischen DSS-induzierten Colitis zu untersuchen, wurde die Methode der semiquantitativen PCR benutzt. Hierfür wurden aus dem distalen Dickdarmbereich von Mäusen mit chronischer Colitis bzw. von gesunden Kontroll-Mäusen Darmgewebe entnommen und daraus RNA isoliert. Der Vergleich von mRNA aus Dickdärmen von Mäusen mit chronischer Colitis mit denen ohne Colitis zeigte, dass weder die Transkription des LTβR-Gens noch die Gene der Liganden LTα bzw. LIGHT in signifikantem Maße reguliert war (Abb. 4-26). Im Gegensatz dazu war die LTβ mRNA-Expression in allen fünf Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis, verglichen mit gesunden Mäusen, signifikant erhöht (Abb. 4-26). Dieses Ergebnis zeigt eine Korrelation der chronisch entzündlichen Manifestation der Colitis in Mäusen mit der Transkription des LTβ-Genes, welches essentielle Proteinsequenz des heterotrimeren LTα<sub>1</sub>β<sub>2</sub> kodiert.

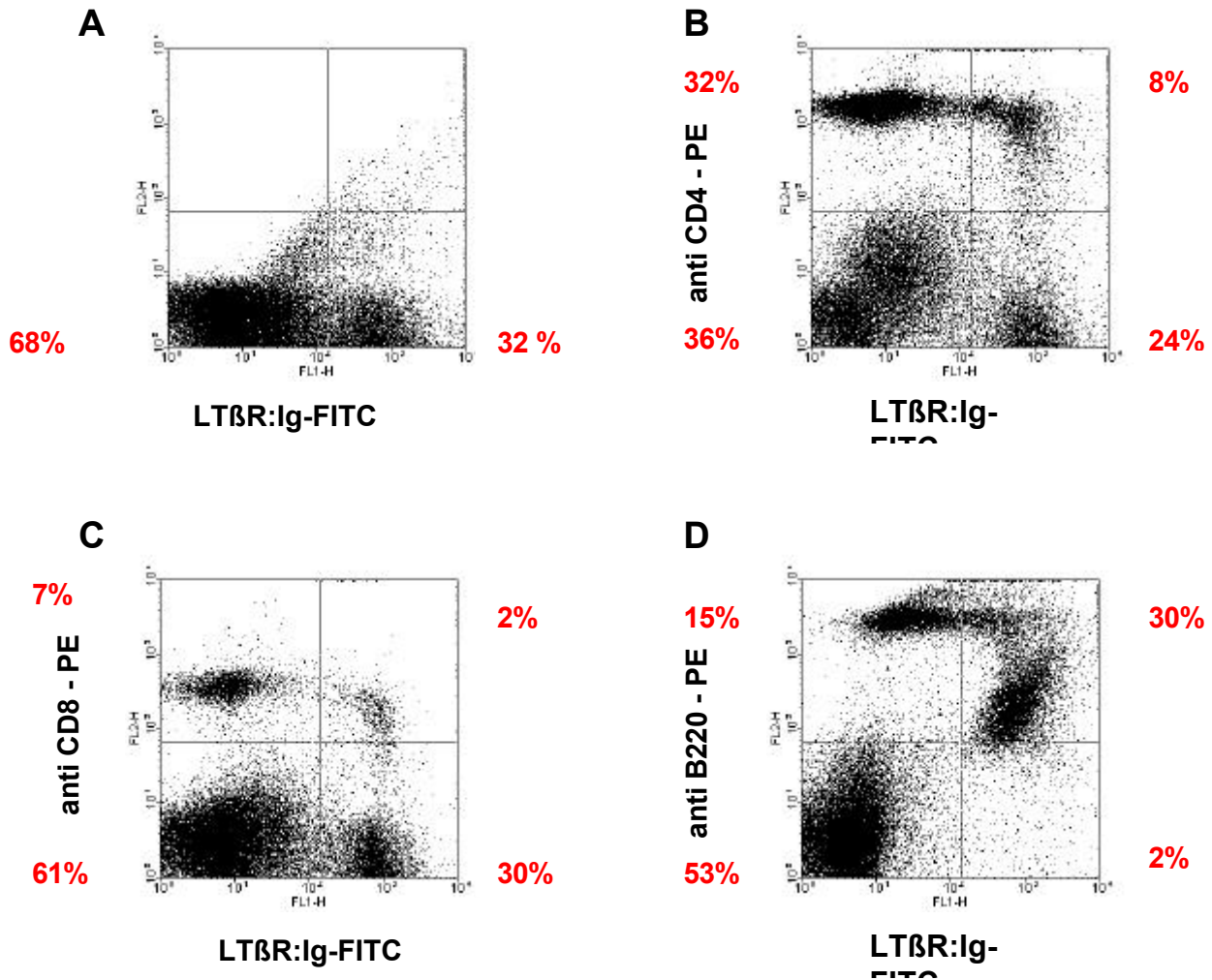


**Abbildung 4-26:**

**Semiquantitative PCR für LTβR/LT-Liganden**, aus Darmgewebe von gesunden Mäusen bzw. Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis (n=5). Als positiv Kontrolle für LTβ, LTα und LIGHT diente mRNA aus PMMI Zellen, als positiv Kontrolle für LTβR diente mRNA aus BFS-1 Zellen. Negativ Kontrolle wurde bei jedem Experiment mit Wasser anstelle von cDNA durchgeführt. Die abgebildeten Banden sind repräsentativ für 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

#### 4.5.3 LTα<sub>1</sub>β<sub>2</sub>/LIGHT Expression auf mesenterialen Lymphozyten

Die Expression von LTα<sub>1</sub>β<sub>2</sub>/LIGHT auf Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten, die aus Mäusen mit einer DSS-induzierten chronischen Colitis stammten, wurde untersucht. Dazu wurden mesenteriale Lymphozyten gewonnen und mit einem FITC-markiertem LTβR:Ig mittels Durchflußzometrie analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-27 A-D dargestellt: Abb. 4-27 A zeigt dass rund 32% aller Zellen aus den mesenterialen Lymphknoten, von Mäusen mit chronischer DSS-induzierten Colitis, die Liganden des LTβR exprimieren. Etwa ein fünftel der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, nämlich 8 % (Abb. 4-27 B), und 2% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 4-27 C) färbten positiv für die Expression von LTβR-Liganden. Den weitaus größten Anteil an LTα<sub>1</sub>β<sub>2</sub>/LIGHT-Positivität zeigten die B220/CD45R<sup>+</sup> Zellen, nämlich 22% (Abb. 4-27 D). Wieder wurde, die in 4.2.2 beschriebene Kreuzreaktion der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen gefunden. Verglichen mit den Ergebnissen von gesunden Mäusen oder Mäusen mit akuter Colitis wird deutlich, dass in der chronischen Form der DSS-induzierten Colitis die Liganden des LTβR vermehrt auf den mesenterialen Lymphozyten exprimiert werden.



**Abbildung 4-27:**

**FACS von mesenterialen Lymphozyten von Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis auf LTα<sub>1</sub>β<sub>2</sub>/LIGHT Expression** mit A) LTβR:Ig-FITC; B) LTβR:Ig-FITC und anti CD4-PE; C) LTβR:Ig-FITC und anti CD8-PE; und D) LTβR:Ig-FITC und anti B220/CD45R-PE. Die mesenterialen Lymphozyten wurden von 5 verschiedenen Mäusen gepoolt und anschließend mittels Durchflußzytometrie analysiert. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

#### 4.5.4 Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Dickdarmgewebe

Um lokale Veränderungen der Zytokinproduktion im Dickdarm von Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis durch LTβR:Ig Gabe zu untersuchen, wurde wieder die Methode der quantitativen PCR mittels Light Cycler benutzt. Hierzu wurde aus dem distalen Dickdarmabschnitten von Mäusen mit chronischer Colitis, entweder LTβR:Ig- oder human IgG-behandelt, RNA isoliert. Anschließend wurde die mRNA Expression von IL-1β, IL-6 und TNF bestimmt. Die Behandlung mit LTβR:Ig in der chronischen DSS-induzierten Colitis verringerte die Transkription von allen drei untersuchten Zytokinen (Tabelle 4-5). Nur etwa 10% der IL-1β mRNA, 2% der IL-6 mRNA und 37% der TNF mRNA, die in Dickdarmgewebe von Mäusen mit human IgG-Behandlung gemessen wurden, waren in den Dickdarmgewebe von LTβR:Ig behandelten Tieren zu beobachten (Tabelle 4-5).

	LT $\beta$ R:Ig		human IgG	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	$1,29 \times 10^{-5}$	$1,17 \times 10^{-5}$	$1,26 \times 10^{-4}$	$1,05 \times 10^{-4}$
<b>IL-6</b>	$1,70 \times 10^{-4}$	$1,39 \times 10^{-4}$	$4,50 \times 10^{-4}$	$4,60 \times 10^{-4}$
<b>TNF</b>	$1,31 \times 10^{-3}$	$1,71 \times 10^{-4}$	$6,19 \times 10^{-3}$	$3,50 \times 10^{-4}$

**Tabelle 4-5:**

**Quantitative PCR von mRNA aus Darmgewebe von Mäusen mit chronischer DSS-inuzierter Colitis.** Angegeben ist die mRNA Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF, aus Mäusen (n=6), die mit LT $\beta$ R:Ig bzw. human IgG behandelt wurden. mRNA wurde mittels Light Cycler Technik quantifiziert. Angegebene Werte sind Mittelwerte von relativen Einheiten.

#### 4.5.5 Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten

Um die Auswirkungen einer LT $\beta$ R:Ig-Behandlung auf die Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten zu untersuchen, wurden Mäusen nach LT $\beta$ R:Ig- bzw. human IgG-Behandlung der chronischen DSS-induzierten Colitis die mesenterialen Lymphknoten entnommen und hieraus eine Zellsuspension hergestellt. Die Überstände der Zellkulturen wurden nach 24 h Inkubation auf die Konzentration von IL-6, TNF und MIP-2 untersucht. Im Zellkulturüberstand von den mesenterialen Lymphozyten aus LT $\beta$ R:Ig-behandelten Mäusen war signifikant weniger IL-6 ( $p=0,05$ ), TNF ( $p=0,005$ ) und MIP-2 ( $p=0,04$ ) messbar im Vergleich zu denen aus human IgG-behandelten Mäusen (Tabelle 4-6). Weder im Zellkulturüberstand LT $\beta$ R:Ig- noch human IgG-behandelter Mäuse war IL-4 feststellbar (nicht gezeigt).

	LT $\beta$ R:Ig		human IgG	
	Mittelwert [pg/ml]	SD	Mittelwert [pg/ml]	SD
<b>IL-6</b>	161,7	40,1	248,7	100,1
<b>TNF</b>	10,1	3,4	37,5	11,3
<b>MIP2</b>	342,6	143	668,8	166,8

**Tabelle 4-6:**

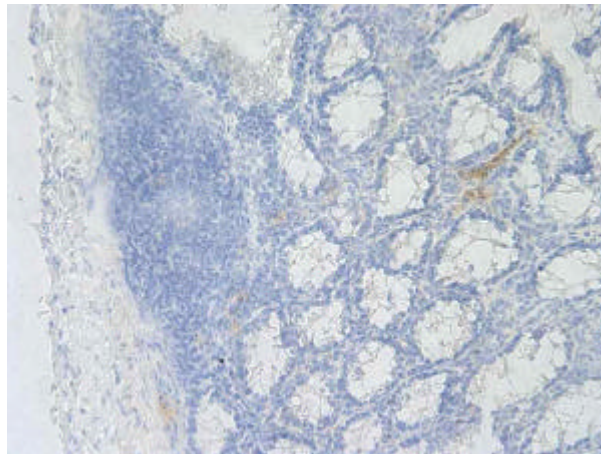
**Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten aus LT $\beta$ R:Ig behandelten Mäusen.** Nach Behandlung der chronischen DSS-induzierten Colitis, entweder human IgG oder LT $\beta$ R:Ig, wurden Mäusen die mesenterialen Lymphknoten entnommen und  $5 \times 10^6$  Lymphozyten/ml für 24 h inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand mittels ELISA auf die Konzentration von IL-6, TNF bzw. MIP-2 untersucht. Die angegebenen Werte sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

#### **4.5.6 Expression von Adhäsionsmolekülen nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung im Dickdarm von Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis**

##### **4.5.6.1 Expression von MadCAM-1 im Dickdarm nach LT $\beta$ R:Ig Behandlung**

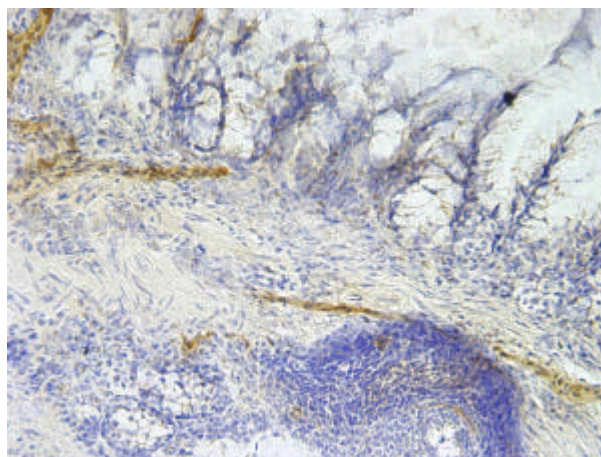
In gesunden Mäusen, die entweder mit LT $\beta$ R:Ig- oder human IgG-behandelt wurden, war nur eine geringe Expression von MadCAM-1 zu beobachten (nicht gezeigt). Bei Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis findet man eine verstärkte Expression von MadCAM-1 (braun-gefärbt) im distalen Dickdarmbereich von Mäusen, die mit human IgG behandelt wurden (Abb. 4-28 A). Dabei wurde MadCAM-1 vor allem auf dem Endothel von Gefäßen der Lamina Propria und auf Gefäßen mit hohem Endothel (high endothelial venules, HEV) der colonic patches gefunden. Die LT $\beta$ R:Ig-Behandlung von Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis führte zu einer deutlich verminderten Expression von MadCAM-1 in distalen Dickdarmbereichen, was sich vor allem auf den HEV der colonic patches aber auch auf den Gefäßen der Lamina Propria zeigte (Abb. 4-28, B).

**A**



**LT $\beta$ R:Ig**

**B**



**human IgG**

**Abbildung 4-28:**

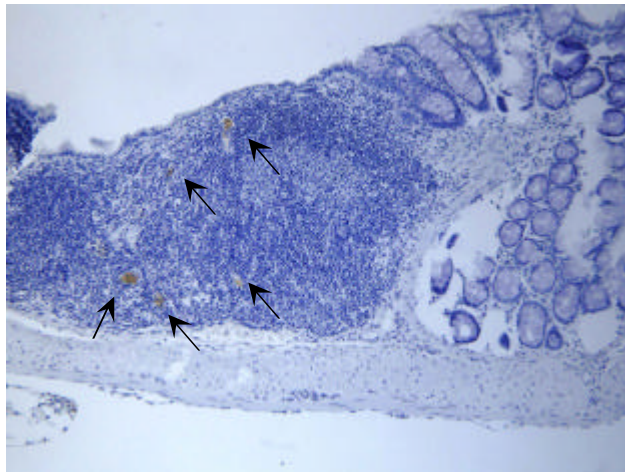
**MadCAM-1-Expression im distalen Dickdarm nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung von Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis.** Aus dem distalen Teil des Dickdarmes wurde Gewebe entnommen und auf MadCAM-1 gefärbt (braun). Die Mäuse waren entweder A) LT $\beta$ R:Ig oder B) human IgG behandelt. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.



### 4.5.6.2 Expression von PNAd im Dickdarm nach LT $\beta$ R:Ig Behandlung

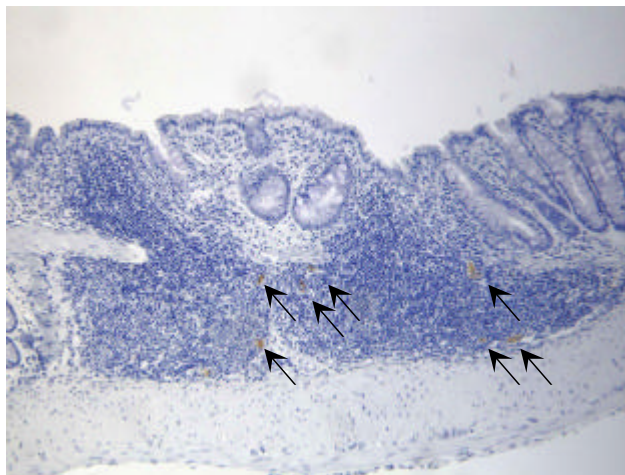
In gesunden Mäusen, die entweder mit LT $\beta$ R:Ig oder human IgG behandelt wurden, war so gut wie keine Expression von peripheral node addressin (PNAd) zu beobachten (nicht gezeigt). Bei Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis wurde in Mäusen, sowohl mit human IgG als auch mit LT $\beta$ R:Ig behandelt, eine leichte Expression von PNAd (braun-gefärbt) auf den HEV der colonic patches gefunden. Zwischen beiden Gruppen bestand jedoch kein Unterschied im Ausmaß der Expression von PNAd (Abb. 4-29, A und B).

**A**



**LT $\beta$ R:Ig**

**B**



**human IgG**

**Abbildung 4-29:**

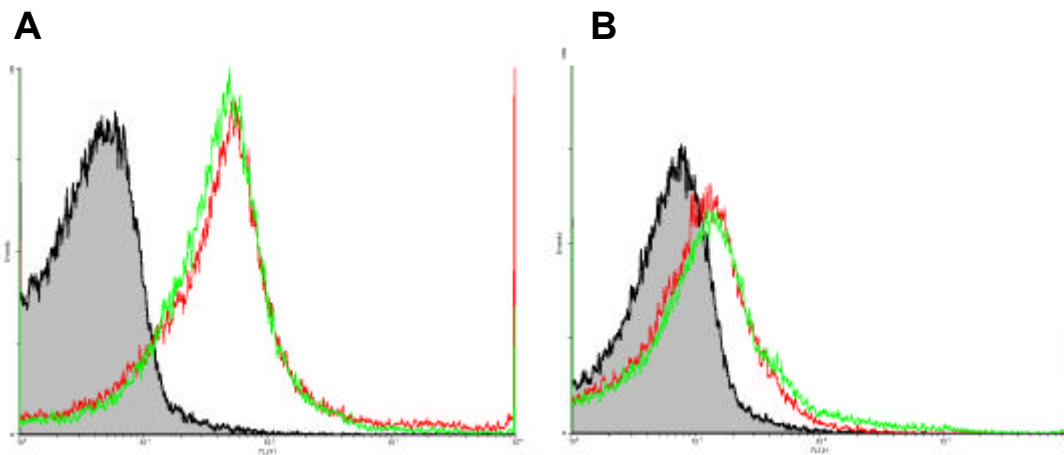
**PNAd-Expression im distalen Dickdarm nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung von Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis.** Aus dem distalen Teil des Dickdarmes wurde Gewebe entnommen und auf PNAd gefärbt (braun). Die Mäuse waren entweder A) LT $\beta$ R:Ig oder B) human IgG behandelt. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

### 4.5.7 Expression der Liganden der Adhäsionsmoleküle auf mesenterialen

#### Lymphozyten nach LT $\beta$ R:Ig Behandlung

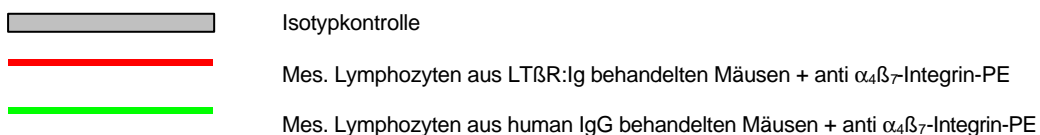
LT $\beta$ R<sup>-/-</sup> Mäuse besitzen einen sehr geringen Anteil an  $\alpha_E\beta_7^{\text{high}}$ -Integrin-positiven Lymphozyten (Fütterer, 1998). Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob sich durch

die Behandlung mit LT $\beta$ R:Ig die Expression von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin (MadCAM-1-Ligand) beeinflussen lässt. Weiterhin wurde noch überprüft, ob die LT $\beta$ R:Ig-Gaben zu einer reduzierten Expression von L-Selectin, dem Liganden von PNAd, führen. Wie Abbildung 4-30 A zeigt, hat die Behandlung von Mäusen mit LT $\beta$ R:Ig keinen Einfluss auf die Expression von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf mesenterialen Lymphozyten, denn es wurde für beide Gruppen, human IgG- und LT $\beta$ R:Ig-behandelt, die gleich hohe Expression dieses Moleküls in der Durchflußzytometrie gemessen. Zusätzlich hatte die Behandlung mit LT $\beta$ R:Ig keinen Einfluss auf die Expression von  $\beta_7$ -Integrin bzw.  $\alpha_E$ -Integrin allein (nicht gezeigt). Auch war die Expression von L-Selectin nicht durch die Gabe von LT $\beta$ R:Ig beeinflussbar, da sich kein Unterschied im Expressionsverhalten auf mesenterialen Lymphozyten aus human IgG- bzw. LT $\beta$ R:Ig-behandelten Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis zeigte (Abb. 4-30 B).



**Abbildung 4-30:**

**Expression von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und L-Selectin auf mesenterialen Lymphozyten nach LT $\beta$ R:Ig Behandlung.** Mesenteriale Lymphozyten aus Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis, die entweder LT $\beta$ R:Ig oder human IgG behandelt waren, wurden auf die Expression von A)  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und B) L-Selectin durch FACS Analyse untersucht. Hierzu wurden die mesenterialen Lymphozyten von 5 Mäusen gepoolt. Die angegebenen Ergebnisse sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführten Ergebnissen



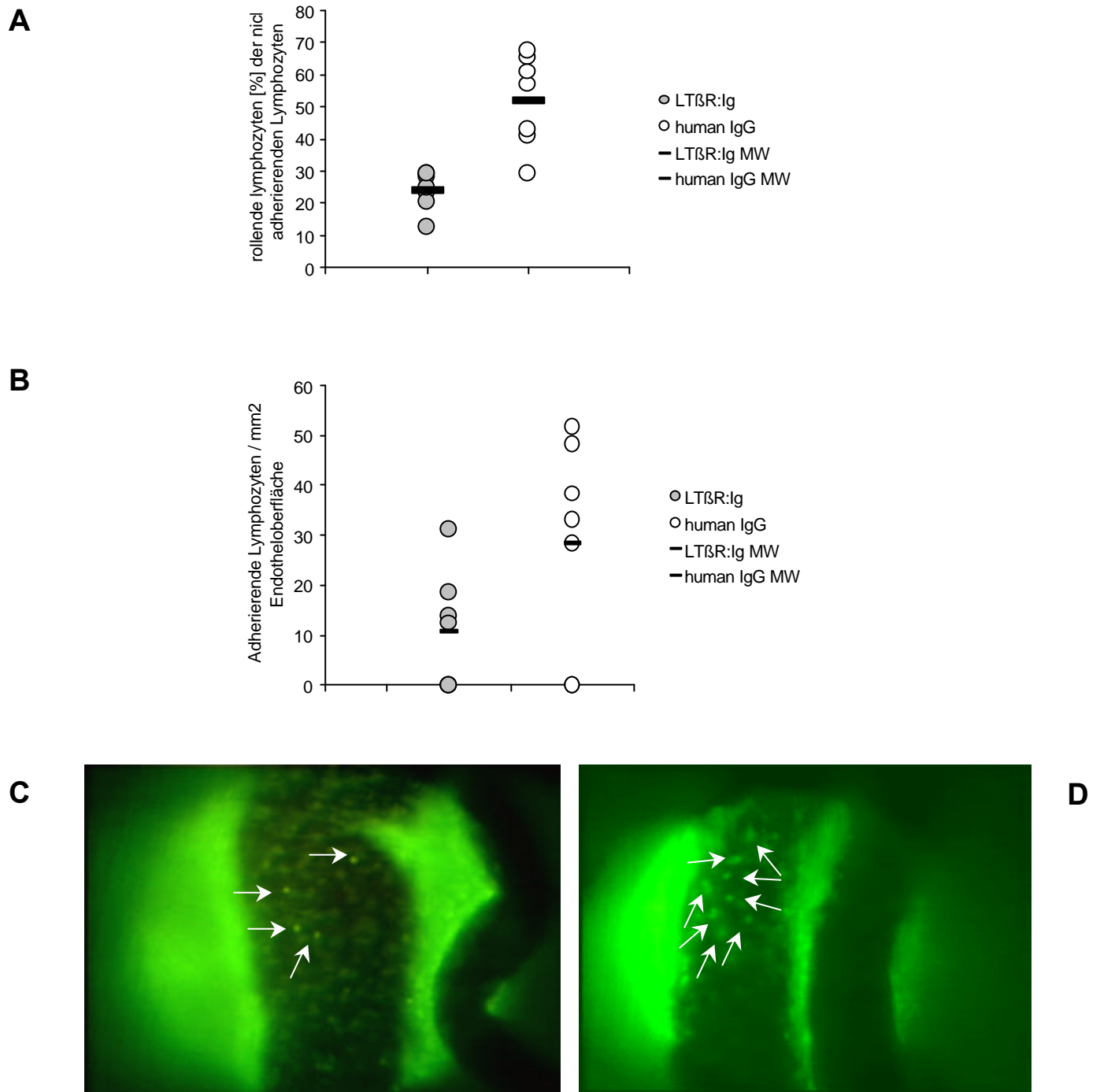
### 4.5.8 „rolling“, „sticking“ und Extravasation von Lymphozyten nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung

Um zu untersuchen, ob die verminderte MadCAM-1-Expression im distalen Dickdarm von Mäusen, mit chronischer DSS-induzierter Colitis, nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung zu einem verminderten Rollen („rolling“), Anhaften („sticking“) oder Extravasieren von Lymphozyten in der Mucosa führt, wurde die Methode der *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie verwendet, mit der die Lymphozyten-Endothel Interaktionen und die Lymphozyten Extravasation in die entzündete Mucosa des Dickdarms quantifiziert werden kann.

### **4.5.8.1 „rolling“ und „sticking“ von Lymphozyten in Sammelvenolen nach LT $\beta$ R:Ig**

#### **Behandlung**

Die Bewegungen von Acridinorange-angefärbten Lymphozyten in Sammelvenolen der Dickdarm-Mukosa bzw. -Submukosa und deren Interaktionen mit dem Gefäßendothel der Sammelvenolen wurden untersucht. In LT $\beta$ R:Ig behandelten Mäusen mit chronischer Colitis war die Anzahl von Lymphozyten, die an der Endothelwand der Sammelvenolen entlang rollten, signifikant verringert verglichen mit denen in human IgG-behandelten Mäusen (Abb. 4-31 A). Zusätzlich war auch das Anhaften von Lymphozyten an die Gefäßwand der Sammelvenolen in der LT $\beta$ R:Ig behandelten Gruppe vermindert (Abb. 4-31 B). Die in Abb. 4-31 A und B dargestellten Daten sind in Abb. 4-31 C und D als Bilder zu sehen. Hierbei handelt es sich jeweils um Aufnahmen von Sammelvenolen der Submucosa. Zusätzlich wurden Videoaufnahmen gemacht, die auf einer CD beigefügt sind (Abb. 4-31 E) LT $\beta$ R:Ig ; Abb. 4-31 F) human IgG).



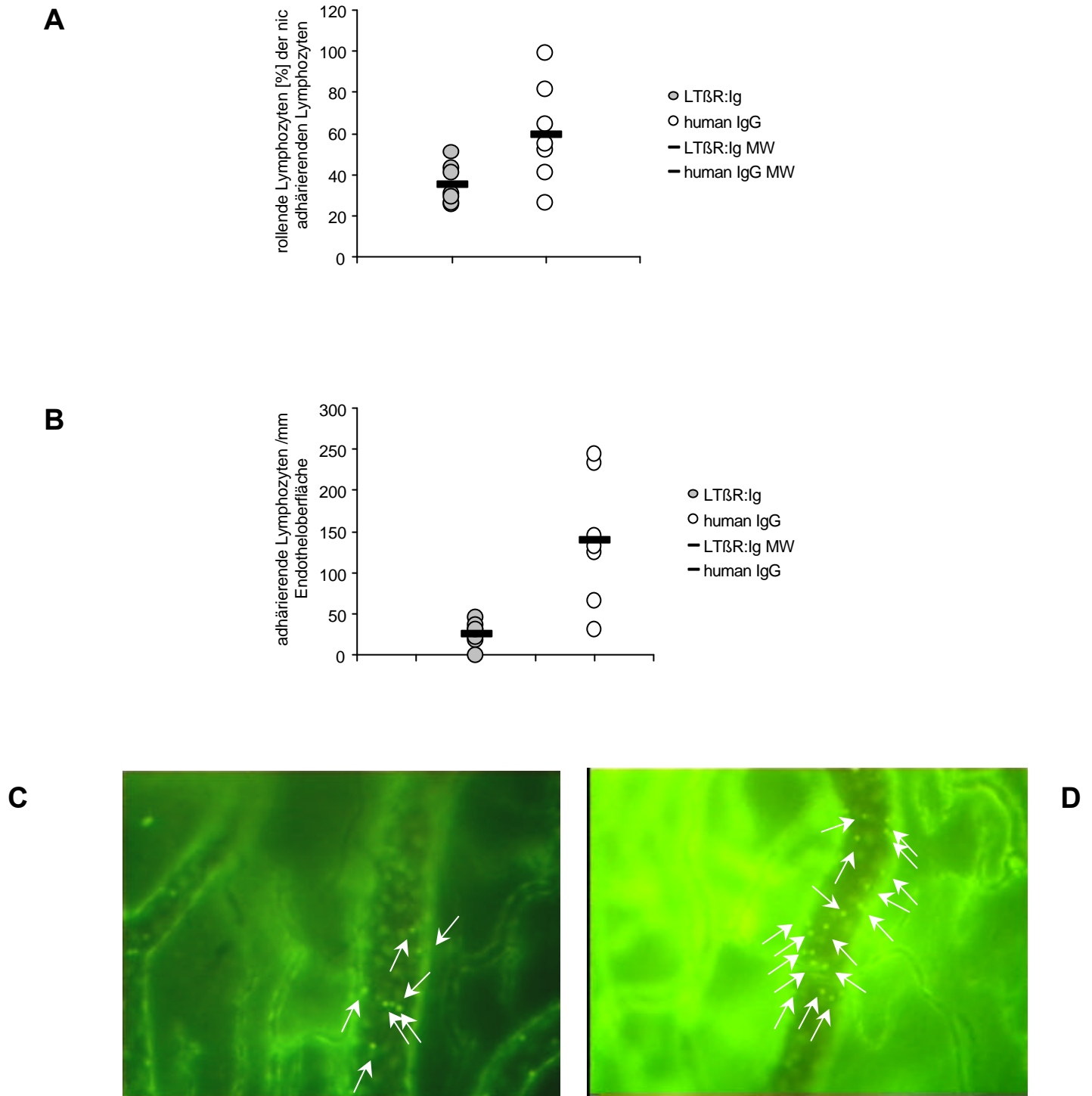
**Abbildung 4-31:**

***In vivo* Mikroskopie der Mikrozirkulation von Lymphozyten in Sammelvenolen der Submucosa.**

In Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis, die entweder mit LTβR:Ig oder human IgG behandelt waren, wurde A) das Rollen und B) das Anheften von Lymphozyten an den Endothelien von Sammelvenolen untersucht. Gezeigt sind Dot Plots. In C) ist ein Bild einer Sammelvenole von einer mit LTβR:Ig behandelten Maus dargestellt in D) die einer mit human IgG behandelten Maus.

### **4.5.8.2 „rolling“ und „sticking“ von Lymphozyten in Postkapillarvenolen nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung**

Wie in den Sammelvenolen war auch in Postkapillarvenolen der Dickdarm-Mukosa bzw. –Submukosa in LT $\beta$ R:Ig-behandelten Mäusen mit chronischer Colitis die Anzahl von Lymphozyten, die an der Endothelwand der Postkapillarvenolen entlang rollten („rolling“), signifikant verringert, verglichen mit denen aus human IgG-behandelten Mäusen (Abb. 4-32 A). Auch war das Anhaften („sticking“) von Lymphozyten an die Gefäßwand der Postkapillarvenolen in der LT $\beta$ R:Ig-behandelten Gruppe signifikant vermindert (Abb. 4-32 B). Die Daten, die in Abb. 4-32 A und B dargestellt wurden, sind in Abb. 4-32 C und D als Bilder zu sehen. Hierbei handelt es sich jeweils um Aufnahmen von Postkapillarvenolen der Dickdarmmukosa. Zusätzlich sind auch Videoaufnahmen auf der CD beigefügt (Abb. 4-32 E) LT $\beta$ R:Ig ; Abb. 4-32 F) human IgG).



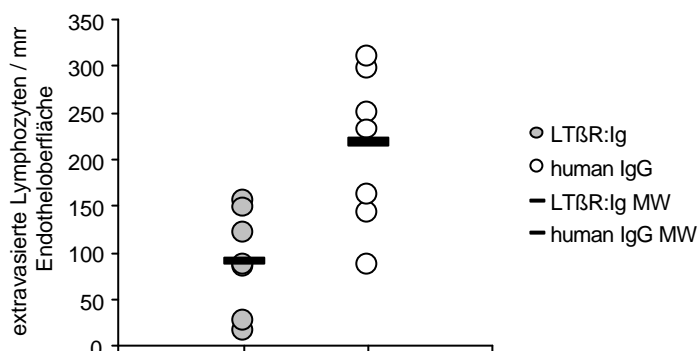
**Abbildung 4-32:**

**In vivo Mikroskopie der Mikrozirkulation von Lymphozyten in Postkapillarvenolen der Submucosa.** In Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis, die entweder mit LTβR:Ig oder human IgG behandelt waren, wurde A) das Rollen und B) das Anheften von Lymphozyten an den Endothelien von Postkapillarvenolen untersucht. Gezeigt sind Dot Plots. In C) ist ein Bild einer Postkapillarvenole von einer mit LTβR:Ig behandelten Maus dargestellt in D) die einer mit human IgG behandelten Maus.

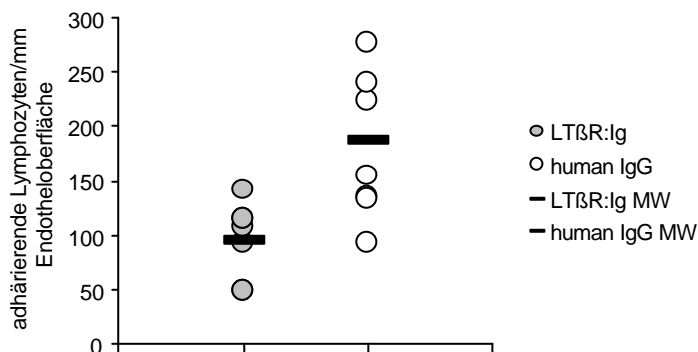
#### 4.5.8.3 Anhaften und Extravasieren von Lymphozyten in der Mucosa nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung

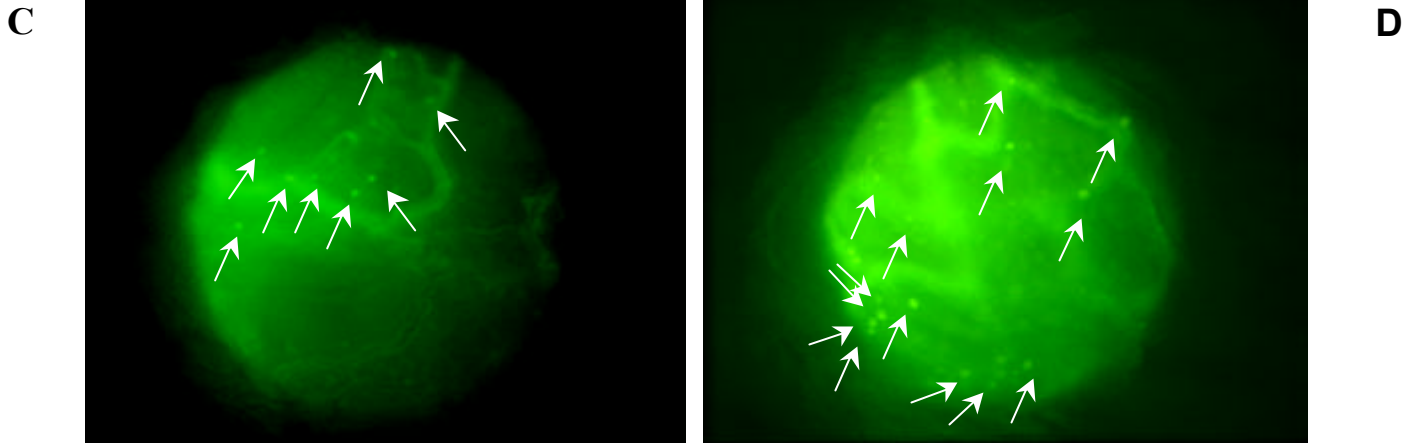
Bei der Untersuchung der Lymphozyten-Extravasation in der Dickdarmmukosa war die Anzahl der anhaftenden bzw. extravasierenden Lymphozyten in den mit LT $\beta$ R:Ig-behandelten Mäusen wiederum signifikant vermindert (Abb. 4-33 A, B). In Abb. 4-33 C, D sind Aufnahmen aus der Dickdarmmukosa mit anhaftenden und extravasierten Lymphozyten gezeigt.

**A**



**B**





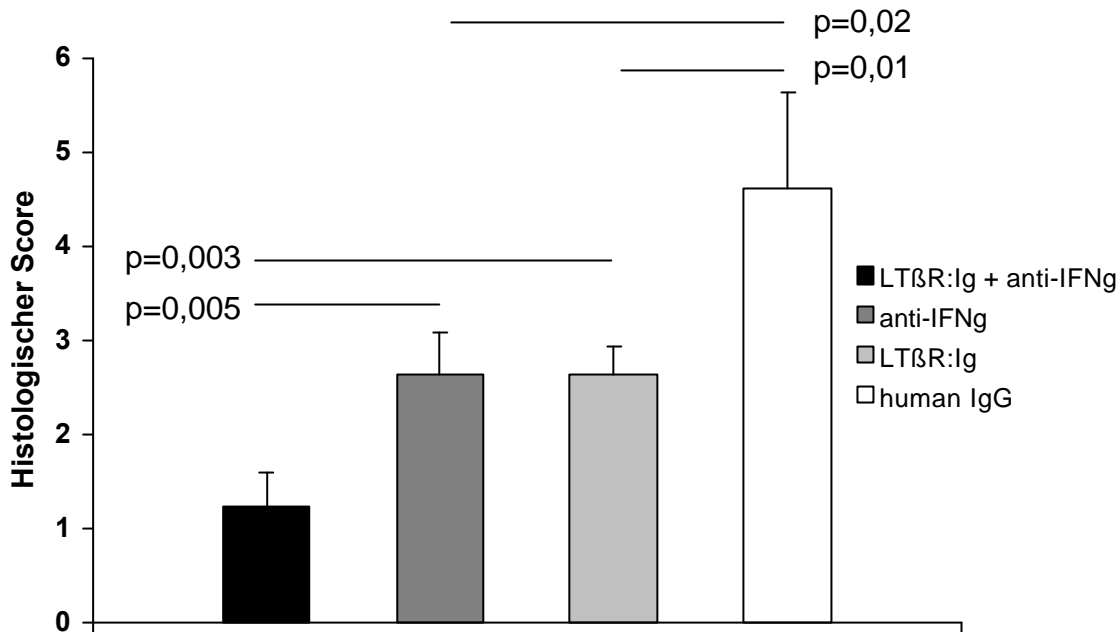
**Abbildung 4-33:**

**In vivo Mikroskopie der Extravasation und Adhäsion von Lymphozyten in der Dickdarmmukosa.** In Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis, die entweder mit LT $\beta$ R:Ig oder human IgG behandelt waren, wurde A) das Extravasieren und B) das Anheften von Lymphozyten an den Endothelien in der Dickdarmmukosa untersucht. Gezeigt sind Dot Plots. In C) ist ein Bild der Mucosa von einer mit LT $\beta$ R:Ig behandelten Maus dargestellt in D) die einer mit human IgG behandelten Maus.

#### 4.5.9 Kombinationsbehandlung mit LT $\beta$ R:Ig und anti-IFN $\gamma$

Obwohl in einem TNBS-induzierten Colitis-Modell in Mäusen war nur ein geringer positiver Effekt einer LT $\beta$ R:Ig-Behandlung messbar war senkte die zusätzliche Neutralisierung von IFN $\gamma$  den histologischen Score signifikant (Dohi, 2001). Daher sollte im DSS-induzierten Model der chronischen Colitis auch diese Kombinationstherapie untersucht werden. Wie Abb. 4-34 zeigt, war bereits durch eine anti-IFN $\gamma$ -Behandlung eine signifikante Verringerung des histologischen Scores zu erzielen, der vergleichbar einer LT $\beta$ R:Ig-Behandlung war. Die kombinierte Gabe von anti-IFN $\gamma$  und LT $\beta$ R:Ig senkte jedoch die Entzündung im Dickdarm nochmals signifikant, was sich in einem zusätzlich erniedrigten histologischen Score widerspiegelt. Dies zeigt einen additiven Therapie-Effekt der anti-IFN $\gamma$ -Therapie zur LT $\beta$ R:Ig-Gabe in der chronischen Form der DSS-induzierten Colitis.





**Abbildung 4-34:**

**Kombinationstherapie mit LTβR:Ig und anti-IFNγ in der chronischen DSS-induzierten Colitis.**

Mäuse (n=7) mit chronischer DSS-induzierter Colitis wurden mit human IgG, LTβR:Ig, anti-IFNγ oder mit LTβR:Ig+anti-IFNγ behandelt. Angegeben ist der histologische Score. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängige Experimente. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann Whitney Rank Sum Test ermittelt.

## 4.6 Chronische DSS-induzierte Colitis in LTβR<sup>-/-</sup> Mäusen

In LTβR<sup>-/-</sup> Mäusen wurde eine chronische Colitis durch DSS-Gabe induziert und mit WT-Mäusen verglichen.

### 4.6.1 Einfluss auf Entzündungsparameter des Dickdarms

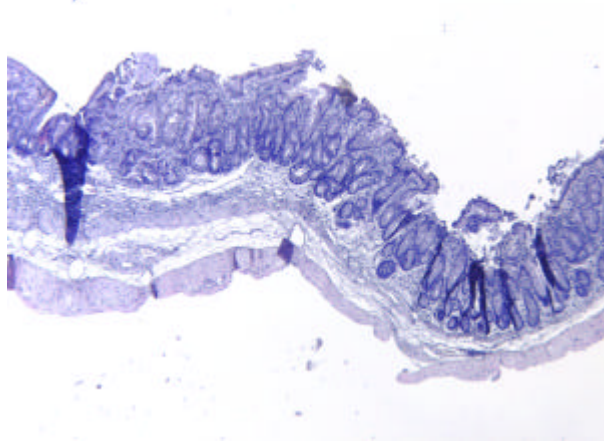
Um Auswirkungen des Fehlens von LTβR in Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis zu analysieren, wurden Mäuse, sowohl LTβR<sup>-/-</sup> als auch WT, 14-21 Tage nach Beendigung des letzten DSS-Zyklus auf das Ausmaß der entwickelten Dickdarmentzündung hin untersucht.

#### 4.6.1.1 Histologie und histologischer Score

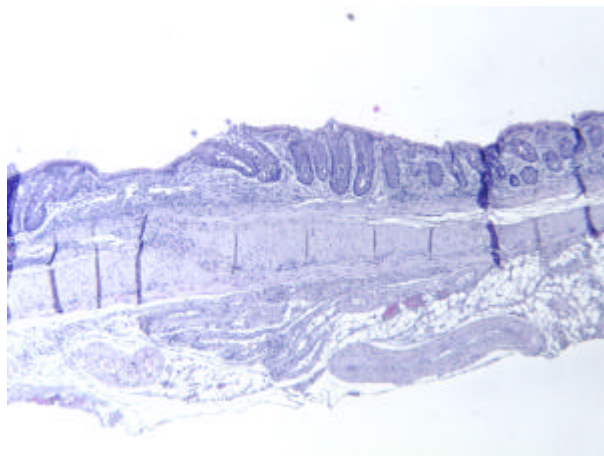
Etwa 2-3 Wochen nach Beendigung des letzten DSS-Zyklus zeigte sich bei den Mäusen folgendes Bild: In den LTβR<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten sich Anzeichen einer milden chronischen Colitis, was sich in einem geringem Verlust von Krypten und Becherzellen bzw. einem

mäßigen entzündlichen Infiltrat zeigte. Es waren vor allem Lymphozyten, die den Hauptteil des entzündlichen Infiltrates stellten (Abb. 4-35 A, oben). Im Gegensatz dazu zeigte sich im distalen Abschnitt des Dickdarmes von WT Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis folgendes Bild: Es konnte ein größerer Verlust von Becherzellen und Krypten verglichen mit den  $LT\beta R^{-/-}$  Mäusen beobachtet werden. Und mehr Lymphozyten waren in die Mukosa eingewandert (Abb. 4-35, A, unten). Zusätzlich war die Mukosa von WT Mäusen mit chronischer Colitis aufgeschwollener, d.h. oedematöser, als die von  $LT\beta R^{-/-}$  Mäusen. Diese Beobachtungen wurden durch den histologischen Score bestätigt: Die  $LT\beta R^{-/-}$  Mäuse mit chronischer Colitis hatten einen signifikant verminderten histologischen Score (Abb. 4-35 B) im Vergleich zu WT Mäusen. Hierbei waren vor allem das entzündliche Infiltrat signifikant erniedrigt. (nicht gezeigt).

**A**

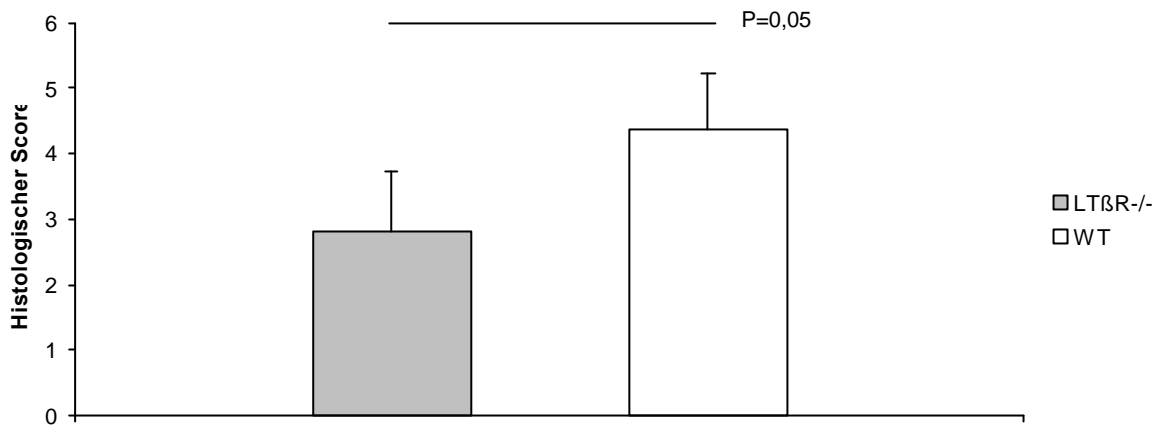


**$LT\beta R^{-/-}$**



**WT**

**B**

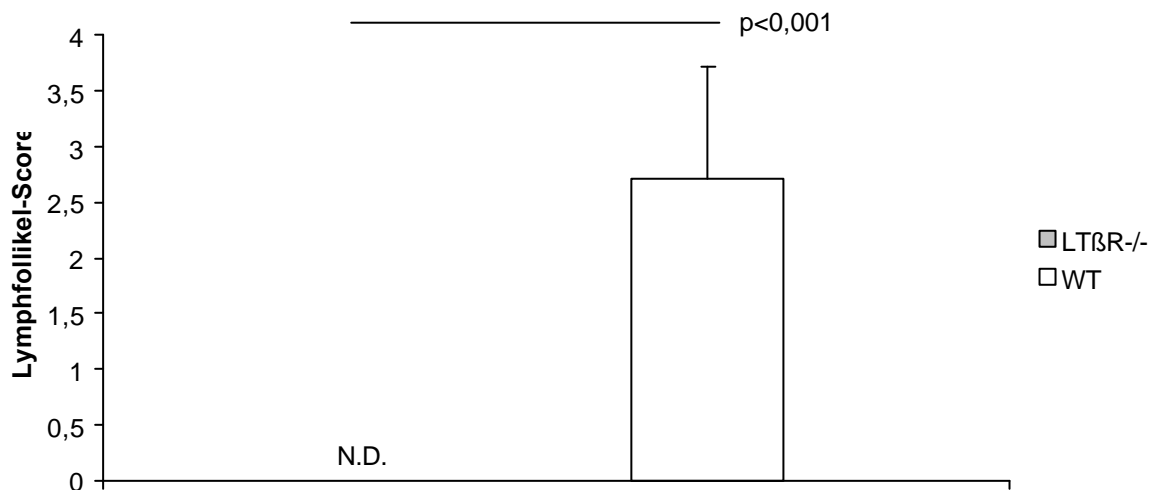


**Abbildung 4-35:**

**Histologie und histologischer Score bei LTβR-/- Mäusen mit DSS-induzierten chronischen Colitis.** A) Histologie der Dickdarmschnitte von LTβR-/- bzw. WT Mäusen nach Anfärbung mit Eosin-Hämatoxylin. B) Der histologische Score wurde im distalen Darmbereich von Mäusen (n=9), entweder LTβR-/- oder WT, mit chronischer DSS-induzierter Colitis gemessen. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± Standardabweichung.

#### 4.6.1.2 Lymphfollikel-Score

In LTβR-/- Mäusen mit chronischer DSS-induzierten Colitis konnten keine colonic patches gefunden werden, wohingegen in WT Mäusen lymphoide Strukturen im Dickdarm vorhanden waren (Abb. 4-36)

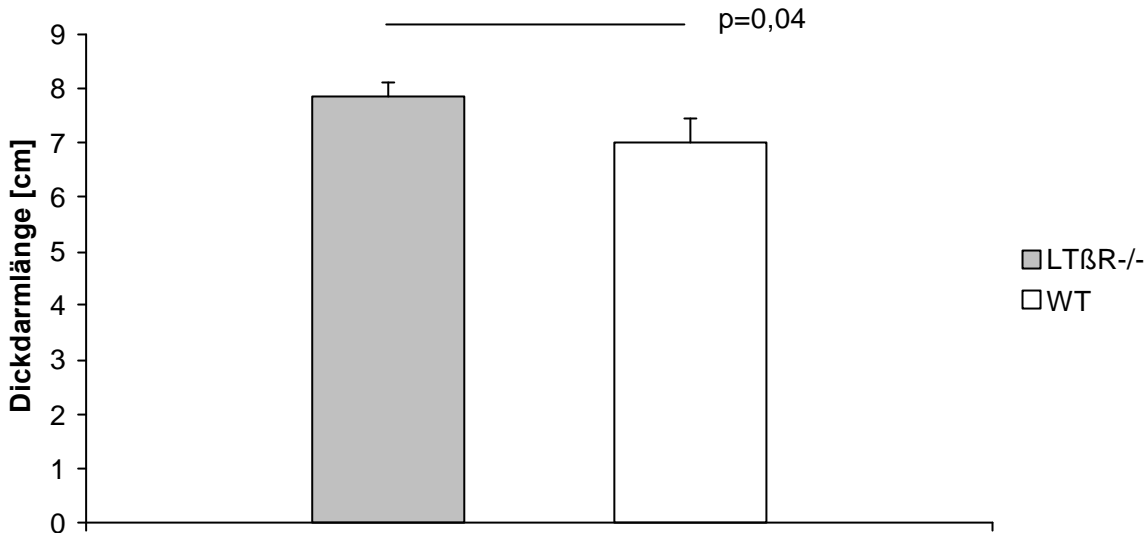


**Abbildung 4-36:**

**Lymphfollikel-Score LTβR-/- Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis.** Von Mäusen (n=9), entweder LTβR-/- oder WT, wurden der Lymphfollikel- Score nach Induktion einer chronischen Colitis durch DSS Gabe ermittelt. Aufgetragen sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Die angegeben Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

### 4.6.1.3 Dickdarmlänge

LT $\beta$ R $^{-/-}$  Mäuse mit chronischer DSS-induzierter Colitis hatten eine signifikant erhöhte Dickdarmlänge verglichen mit WT Mäusen (Abb. 4-37).



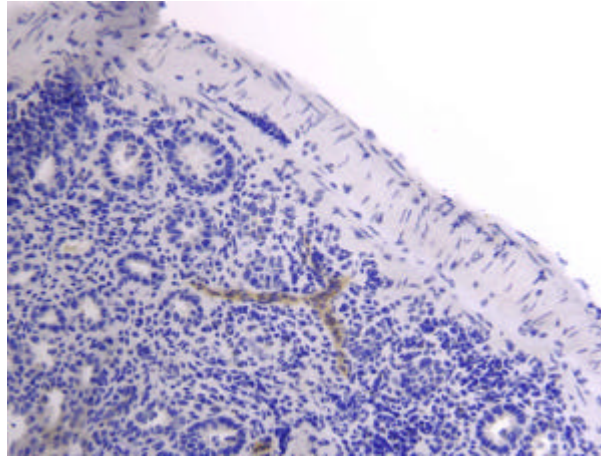
**Abbildung 4-37:**

**Dickdarmlängen der LT $\beta$ R $^{-/-}$  Mäuse mit chronischer DSS-induzierter Colitis.** Die Dickdarmlängen, angegeben in cm, von LT $\beta$ R $^{-/-}$  oder WT Mäusen (n=9) wurde nach der Induktion einer chronischen DSS-induzierten Colitis gemessen. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

### 4.6.2 MadCAM-1 Färbung

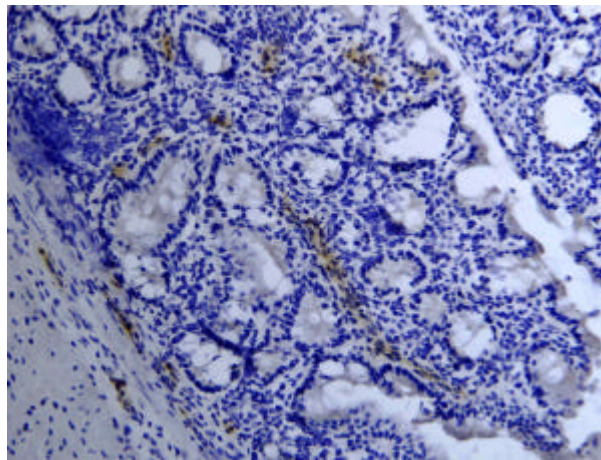
Wie bei BALB/c Mäusen haben auch C57Bl/6 Mäuse mit chronischer DSS-induzierter Colitis eine verstärkte Expression von MadCAM-1 (braun-gefärbt) im distalen Dickdarmbereich (Abb. 4-38 B), wobei MadCAM-1 vor allem auf Endothel von Gefäßen der Lamina Propria gefärbt wird. Die Färbung von MadCAM-1 in Dickdarmbiopsien von LT $\beta$ R $^{-/-}$  Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis dagegen zeigt deutlich weniger MadCAM-1 in distalen Dickdarmbereichen, besonders auf den HEV der colonic patches aber auch auf den Gefäßen der Lamina Propria (Abb. 4-38, A). Die Expression von MadCAM-1 wird durch das Fehlen von LT $\beta$ R jedoch nicht völlig unterbunden, sondern nur reduziert.

**A**



**LTβR-/-**

**B**



**WT**

**Abbildung 4-38:**  
**MadCAM-1-Expression im distalen Dickdarm von LTβR-/- Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis.** Aus dem distalen Teil des Dickdarmes wurde Gewebe entnommen und auf MadCAM-1 gefärbt (braun). Die Mäuse waren entweder A) LTβR-/- oder B) WT. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

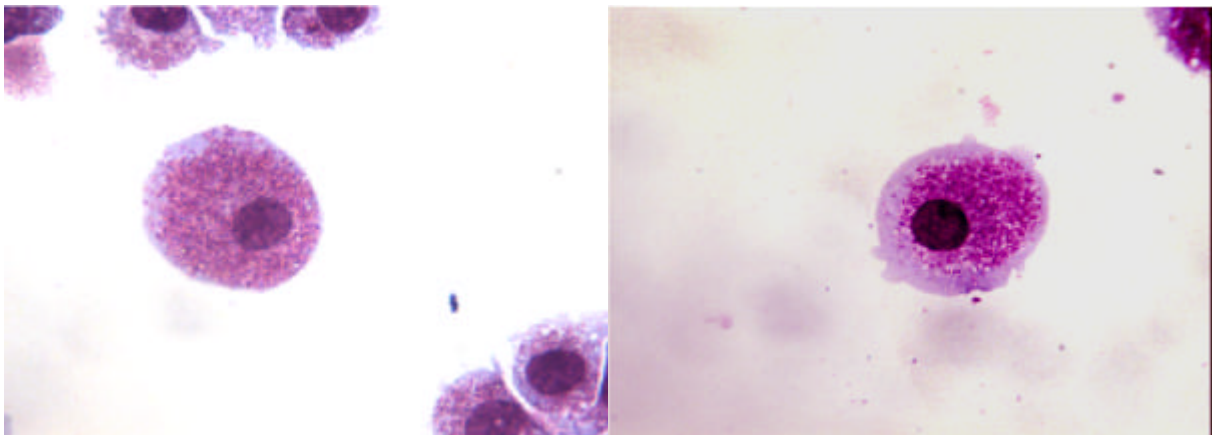
## 4.7 Expression und Funktionalität des LT $\beta$ R auf BMMC

### 4.7.1 Mastzellspezifität der BMMC

BMMC wurden aus Knochenmarkstammzellen herangezogen. Hierfür wurden als Knochenmarkspender C57BL/6 WT (LT $\beta$ R $^{+/+}$ ) oder LT $\beta$ R $^{-/-}$  Mäuse verwendet. Auch von Knochenmarkstammzellen aus BALB/c Mäusen wurden BMMC herangezogen. Besonders wichtig ist die Anwesenheit von IL-3 und SCF im Kulturmedium, damit sich die Knochenmarkstammzellen zu BMMC differenzieren.

#### 4.7.1.1 May-Grünwald- und Toluidinblau-Färbung

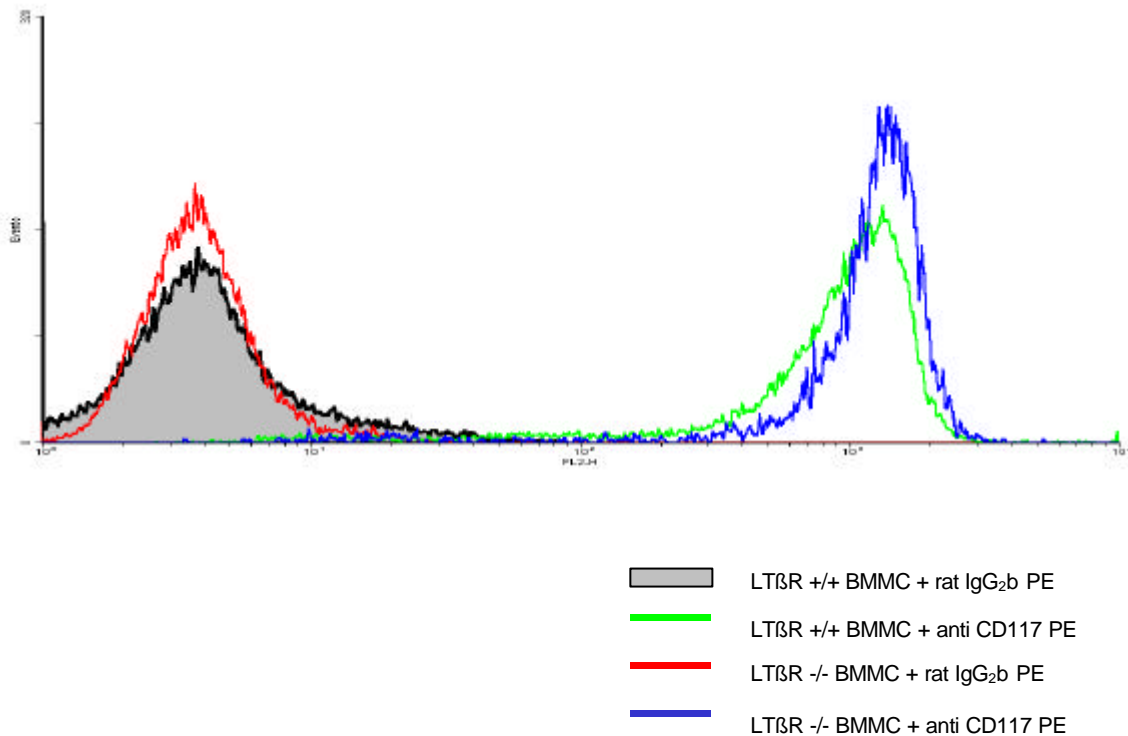
Zur phänotypischen Bestimmung der BMMC wurde May-Grünwald- und Toluidinblau-Färbung verwendet, wodurch die für Mastzellen charakteristischen Granula angefärbt werden. Nach sechswöchiger Kultur zeigten sowohl die LT $\beta$ R $^{+/+}$  als auch die LT $\beta$ R $^{-/-}$  BMMC die charakteristische May-Grünwald-Färbung der Granula. Es war kein Unterschied zwischen den WT und LT $\beta$ R $^{-/-}$  BMMC zu erkennen (Abb. 4-39 A, B). Durch mikroskopische Auswertung der erhaltenen BMMC konnte eine Reinheit von etwa 98% festgestellt werden. Bei der Toluidinblau-Färbung zeigte sich das gleiche Ergebnis (nicht gezeigt), mit einer Reinheit der BMMC von etwa 98%.



**Abbildung 4-39:**  
**May-Grünwald-Färbung von BMMC.** A) LT $\beta$ R  $^{+/+}$  und B) LT $\beta$ R $^{-/-}$  BMMC wurden nach May-Grünwald angefärbt.

#### 4.7.1.2 FACS-Analyse der BMMC auf CD117 Expression

CD117, auch bekannt als c-kit oder SCF-Rezeptor, ist ein charakteristischer Marker für Mastzellen, da diese die einzigen Zellen hämatopoetischen Ursprungs sind, die CD117 als reife Zellen noch exprimieren (Karimi, 1999). Daher wurden die BMMC, entweder LT $\beta$ R $^{+/+}$  oder LT $\beta$ R $^{-/-}$ , auf die Expression von CD117 mit Hilfe von Durchflußzytometrie untersucht. Dabei zeigte sich nach sechswöchiger Kultur der BMMC kein Unterschied zwischen den LT $\beta$ R $^{+/+}$  und LT $\beta$ R $^{-/-}$  BMMC in deren CD117 Expression. Bei beiden Mastzell-Populationen war eine hohe Expression von c-kit feststellbar (Abb. 4-40).



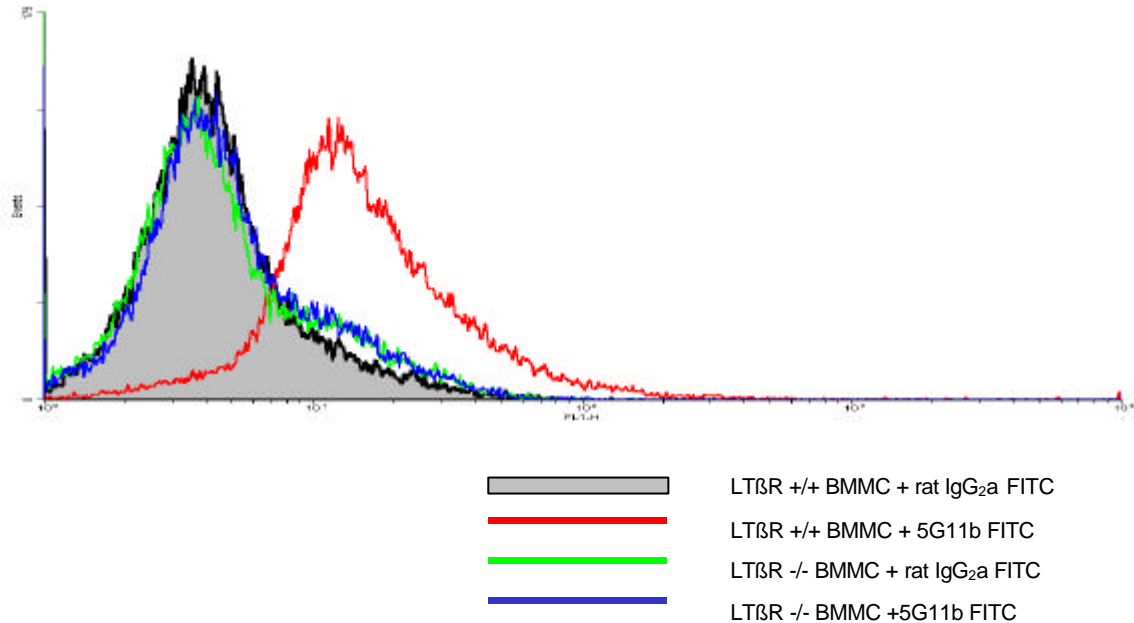
**Abbildung 4-40:**

**FACS der BMMC auf CD117 Expression.** Die sechs Wochen in IL-3 und SCF kultivierten BMMC, entweder LTβR+/+ oder LTβR -/-, wurden auf die Expression von CD117 mit Hilfe von FACS Analyse untersucht.

## 4.7.2 Nachweis der LTβR-Expression von BMMC

### 4.7.2.1 FACS-Analyse

Um zu untersuchen, ob BMMC LTβR auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurde zunächst die Methode der Durchflußzytometrie gewählt, wobei BMMC, entweder LTβR +/+ oder LTβR-/-, mit dem spezifischen anti-Maus LTβR monoklonalen Antikörper 5G11b (Hehlgans, 2003) in der FACS-Analyse getestet wurden. Die Durchflußzytometrie zeigte deutlich, dass LTβR -/- BMMC kein LTβR-Protein auf ihrer Oberfläche tragen, denn es war kein Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen der Isotypkontrolle und der 5G11b behandelten Proben zu erkennen (Abb. 4-41). Bei LTβR+/+ BMMC war jedoch eine deutliche Expression von LTβR auf der Zelloberfläche zu beobachten, was durch den Fluoreszenzunterschied zwischen Isotypkontrolle und 5G11b behandelten BMMC klar sichtbar wurde (Abb. 4-41). Für BMMC, die aus Knochenmarkstammzellen von BALB/c Mäusen generiert wurden, konnte der LTβR-Expression mittels Durchflußzytometrie nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Auf der Mastzell-Zelllinie L138.8A zeigte sich keine Expression von LTβR auf der Zelloberfläche (nicht gezeigt).

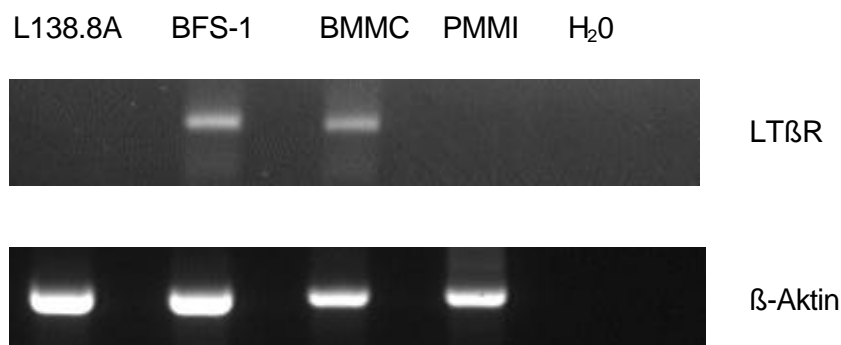


**Abbildung 4-41:**

**FACS Analyse der BMMC auf LTβR Expression.** BMMC, entweder LTβR+/+ oder LTβR-/-, wurden auf die Expression von LTβR auf der Zelloberfläche mittels Durchflußzytometrie untersucht. Die Daten sind repräsentativ für vier voneinander unabhängige Experimente.

#### 4.7.2.2 PCR-Analyse

Um das Vorkommen von mRNA für LTβR in Mastzellen zu untersuchen, wurde mRNA von LTβR+/+ BMMC bzw. der Mastzell-Zelllinie L138.8A verwendet. Als Positivkontrolle diente mRNA von BFS-1 Zellen (Hehlhans, 2002). Als Negativkontrolle wurde mRNA aus PMMI Zellen verwendet. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde beim Ansatz der PCR noch Wasser anstatt von cDNA verwendet. Abb. 4-42 zeigt deutlich, dass BMMC mRNA für LTβR produzieren. Als Kontrolle für die aufgetragenen cDNA Mengen diente β-Aktin. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch im Southern Blot (nicht gezeigt).



**Abbildung 4-42:**

**PCR Analyse der LTβR Expression von BMMC.** Aus den Zelllinien L138.8A, BFS-1 und PMMI und aus BMMC, die aus LTβR+/+ Mäusen generiert wurden, wurde mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und durch PCR Analyse die Expression von LTβR untersucht. Die Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige durchgeführte Experimente.



Diese Ergebnisse verdeutlichen zum ersten Mal, dass BMMC LT $\beta$ R tragen. Bis jetzt war nur bekannt, dass LT $\beta$ R auf Stromazellen und auf Monozyten exprimiert ist (Crowe, 1994; Force, 1995; Browning, 1997; Browning, 2002)

### **4.7.3 mLIGHT- und 5G11b- Stimulierung von Ionomycin aktivierten BMMC**

Es wurde untersucht, ob selektive Stimulierung des LT $\beta$ R auf BMMC zur Freisetzung von Zytokinen führt. Denn es ist seit längerem bekannt, dass Aktivierung von Mastzellen nicht nur zur schnellen Freisetzung von Histamin und anderen präformierten Mediatoren führt, sondern auch zur Produktion von verschiedenen Zytokinen wie TNF, IL-6 oder Chemokinen wie RANTES (Henz, 2001).

#### **4.7.3.1 Zytokinfreisetzung**

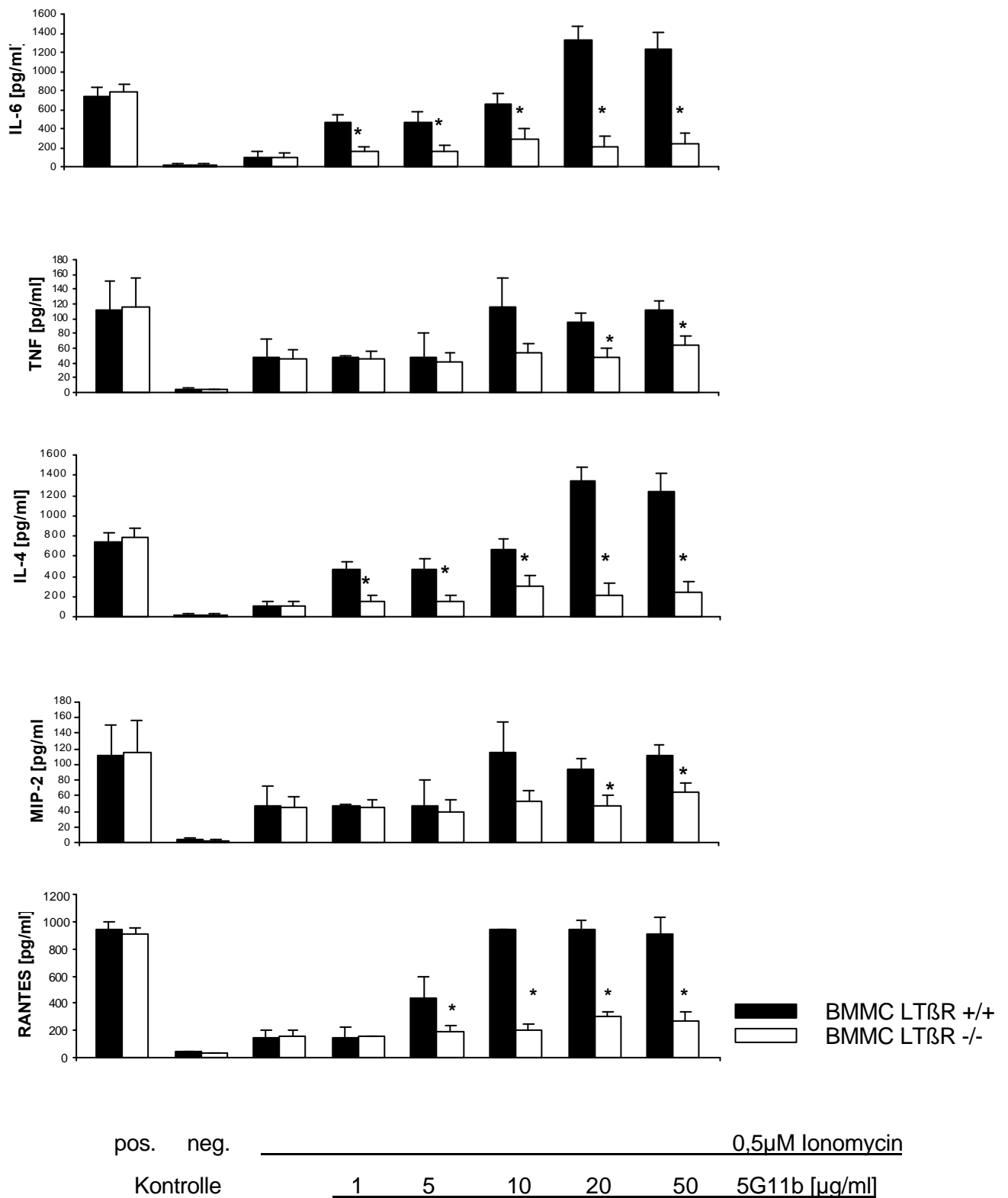
BMMC, entweder aus LT $\beta$ R+/+ oder LT $\beta$ R-/- Mäusen stammend, wurden in Anwesenheit von 0,5 $\mu$ M Ionomycin mit anti-Maus LT $\beta$ R monoklonalen Antikörper 5G11b aktiviert. Nach 24 h Kultivierung unter den angegebenen Bedingungen wurde im Zellkulturüberstand die Konzentration von verschiedenen Zytokinen bzw. Chemokinen (IL-4, IL-6, TNF, MIP-2 und RANTES) mit der Hilfe von spezifischen ELISAs quantifiziert. Abb. 4-43 A zeigt, dass zwischen den BMMC aus LT $\beta$ R-/- bzw. LT $\beta$ R+/+ Mäusen kein Unterschied in der generellen Fähigkeit zur Zytokinsekretion besteht. Hier konnten gleich hohe Zytokinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen der BMMC, die mit der Positivkontrolle (2 $\mu$ M PMA und Ionomycin) behandelt wurden, festgestellt werden. Die Anwesenheit von 0,5 $\mu$ M Ionomycin war ausreichend, um BMMC zur Freisetzung von signifikant mehr IL-4, IL-6, TNF, MIP-2 und RANTES zu stimulieren, als diese spontan produzierten (Abb. 4-43 A). Durch gleichzeitige Zugabe von 5G11b und 0,5 $\mu$ M Ionomycin zu den BMMC, wurde eine dosisabhängige Zytokinfreisetzung von IL-4, IL-6, TNF, MIP-2 und RANTES aus den LT $\beta$ R+/+ BMMC festgestellt. Dem gegenüber enthielten die Zellkulturüberstände der LT $\beta$ R-/- BMMC bei gleicher Stimulation signifikant weniger der angegebenen Zytokine bzw. Chemokine (Abb. 4-43 A). Jedoch wurden die einzelnen Zytokine/Chemokine nicht in gleichem Maße freigesetzt. Vor allem MIP-2 wurde nur wenig von BMMC nach LT $\beta$ R Aktivierung sezerniert (110-115 pg/ml nach Stimulation mit 20 und 50  $\mu$ g/ml 5G11b); IL-4, IL-6, TNF und RANTES wurden in weit höherer Konzentration im Zellkulturüberstand gefunden. In der Abwesenheit von Ionomycin konnten BMMC durch 5G11b Stimulierung nicht zur Freisetzung von Zytokinen aktiviert werden (nicht gezeigt).

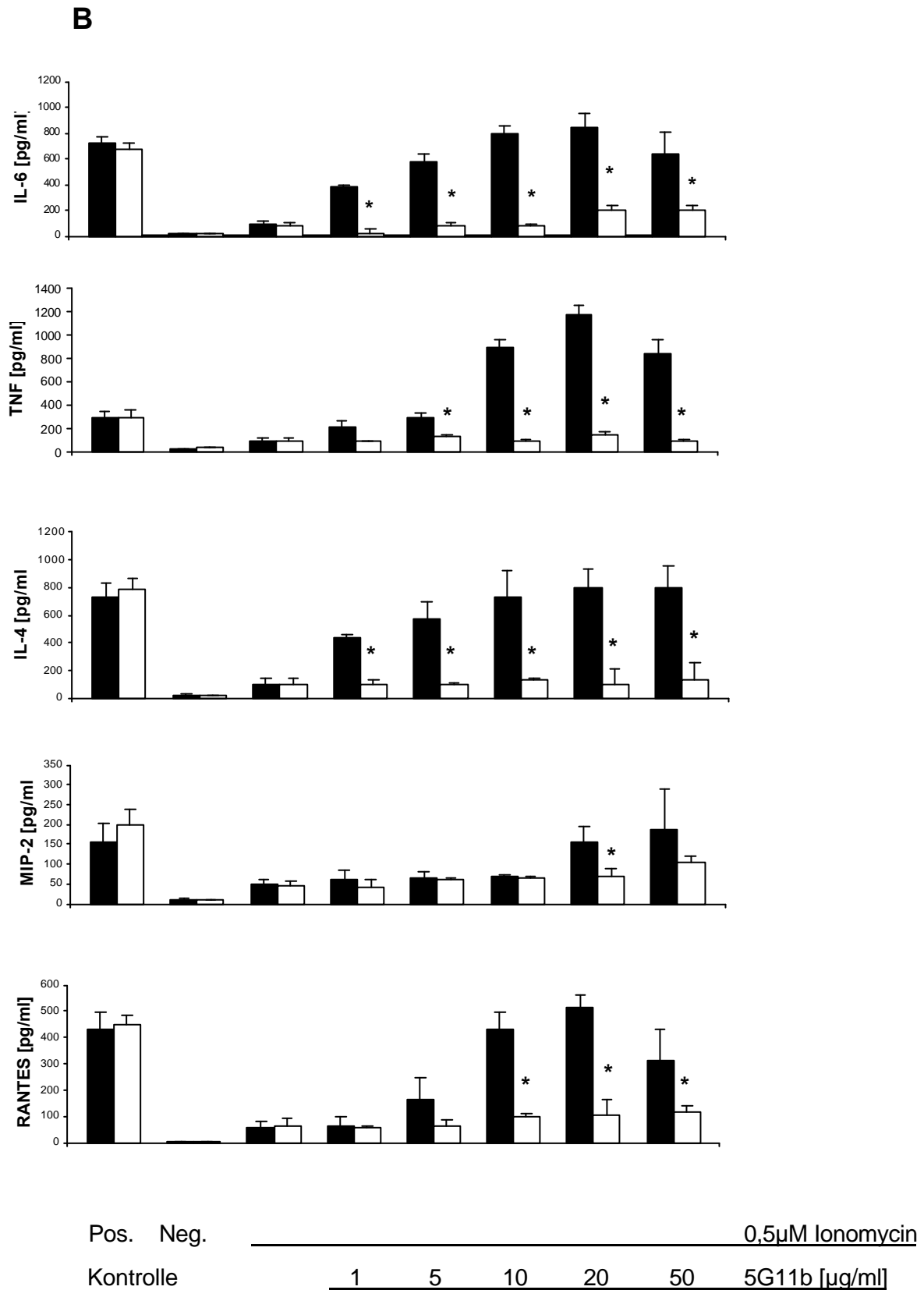
Fast das gleiche Ergebnis wie in 4-43 A zeigte sich in 4-43B. Hier wurden BMMC durch die Zugabe von mLIGHT, anstatt von 5G11b, bei gleichzeitiger Gabe von 0,5 $\mu$ M Ionomycin zur Freisetzung der Zytokine IL-4, IL-6, TNF und der Chemokine MIP-2 und RANTES aktiviert.

## Ergebnisse

Auch hier zeigte sich, dass in der Abwesenheit von Ionomycin, keine Zytokinfreisetzung von BMMC durch die alleinige Gabe von mLIGHT zu erreichen war (nicht gezeigt).

**A**





**Abbildung 4-43:**  
**Zytokinsekretion von BMMC nach LTβR Stimulierung.** BMMC, entweder LTβR+/+ oder LTβR-/-, wurden in der Gegenwart von 0,5μM Ionomycin und steigenden Mengen an A) 5G11b bzw. B) mLIGHT stimuliert. Die freigesetzten Zytokine/Chemokine wurden mit Hilfe von ELISAs quantifiziert.

Die angegebenen Ergebnisse sind repräsentativ für vier voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  STABW (n=3) der gemessenen Zytokinkonzentrationen. Statistische Signifikanz wurde mit dem Student's T-Test ermittelt.

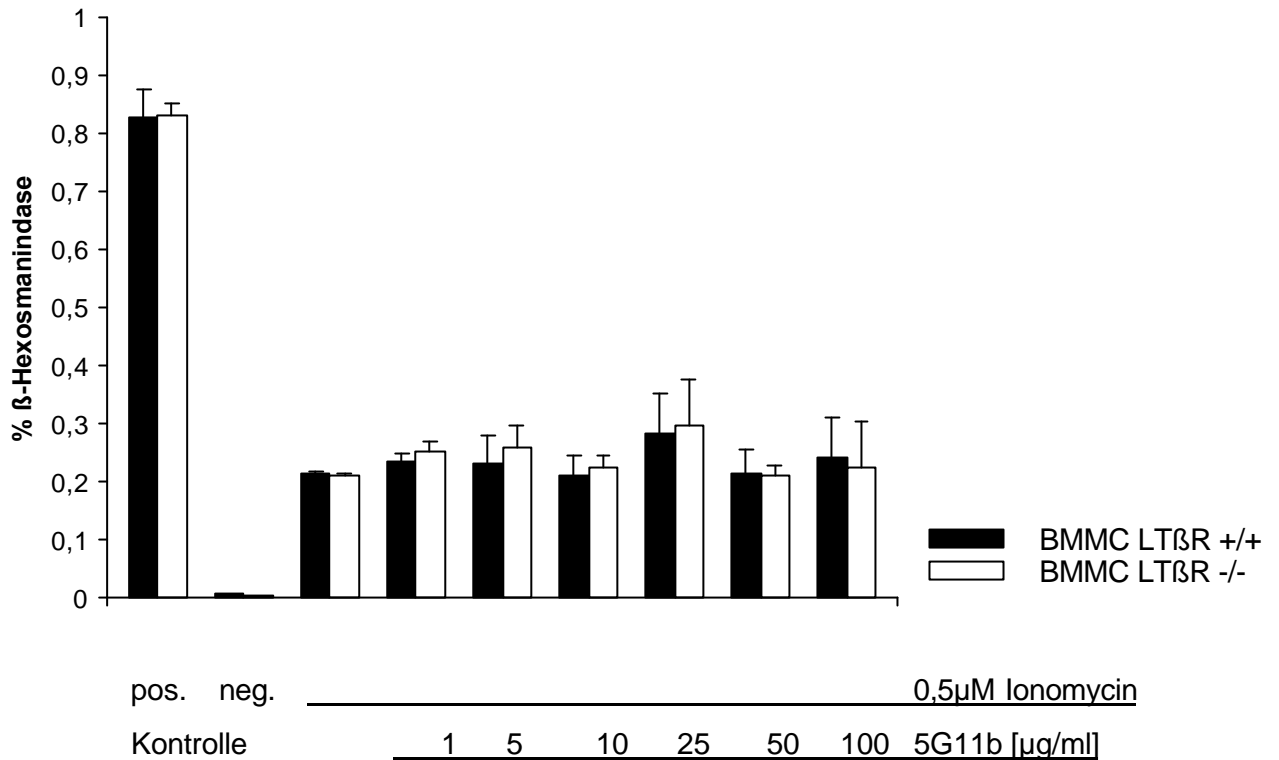
### 4.7.3 Degranulation

Zur Untersuchung des Degranulationsverhaltens von BMMC nach LT $\beta$ R-Stimulierung in Anwesenheit von 0,5 $\mu$ M Ionomycin wurde die Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase gemessen, was einen sehr guten Marker für die schnelle, d.h. innerhalb von Minuten ablaufende, Freisetzung von präformierten Mediatoren aus BMMC darstellt.

Hierzu wurden BMMC, aus LT $\beta$ R $^{-/-}$  oder LT $\beta$ R $^{+/+}$  Mäusen generiert, mit zunehmenden Mengen an 5G11b in der Anwesenheit von 0,5 $\mu$ M Ionomycin stimuliert. Die Stimulierung mit 5G11b hatte keinen Effekt auf die Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase aus BMMC. Es konnte bei allen Konzentrationen von zugesetztem 5G11b nur das Ausmaß an freigesetzter  $\beta$ -Hexosaminidase gemessen werden, das bereits durch 0,5 $\mu$ M Ionomycin allein ausgeschüttet wurde (Abb. 4-44). Jedoch wurde durch die Zugabe von 2 $\mu$ M PMA und Ionomycin, was als Positivkontrolle verwendet wurde, eine fast vollständige Degranulation der BMMC, sowohl LT $\beta$ R $^{+/+}$  als auch LT $\beta$ R $^{-/-}$ , gemessen (Abb. 4-44). Dies zeigt, dass das Fehlen von LT $\beta$ R auf BMMC nicht zu einem grundsätzlich verminderten Freisetzungsvermögen der BMMC von präformierten Mediatoren führt.

Die Zugabe von steigenden Mengen an mLIGHT zu BMMC, entweder LT $\beta$ R $^{+/+}$  oder LT $\beta$ R $^{-/-}$ , in der Gegenwart von 0,5 $\mu$ M Ionomycin konnte keine LT $\beta$ R spezifische Degranulation der BMMC induzieren (nicht gezeigt).

Die Stimulierung von BMMC mit 5G11b oder mLIGHT ohne zusätzliches Ionomycin führte zu keiner messbaren Degranulation von BMMC (nicht gezeigt).



**Abbildung 4-44:**

**β-Hexosaminidase Freisetzung von BMMC nach LTβR Stimulierung.** BMMC, aus LTβR +/+ und LTβR -/- Mäusen, wurden mit steigenden Mengen an 5G11b in der Anwesenheit von 0,5μM Ionomycin stimuliert. Angegeben ist die Freisetzung an β-Hexosaminidase in % vom Gesamtgehalt an gespeicherter β-Hexosaminidase. Gezeigt sind Mittelwerte ± STABW (n=3). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

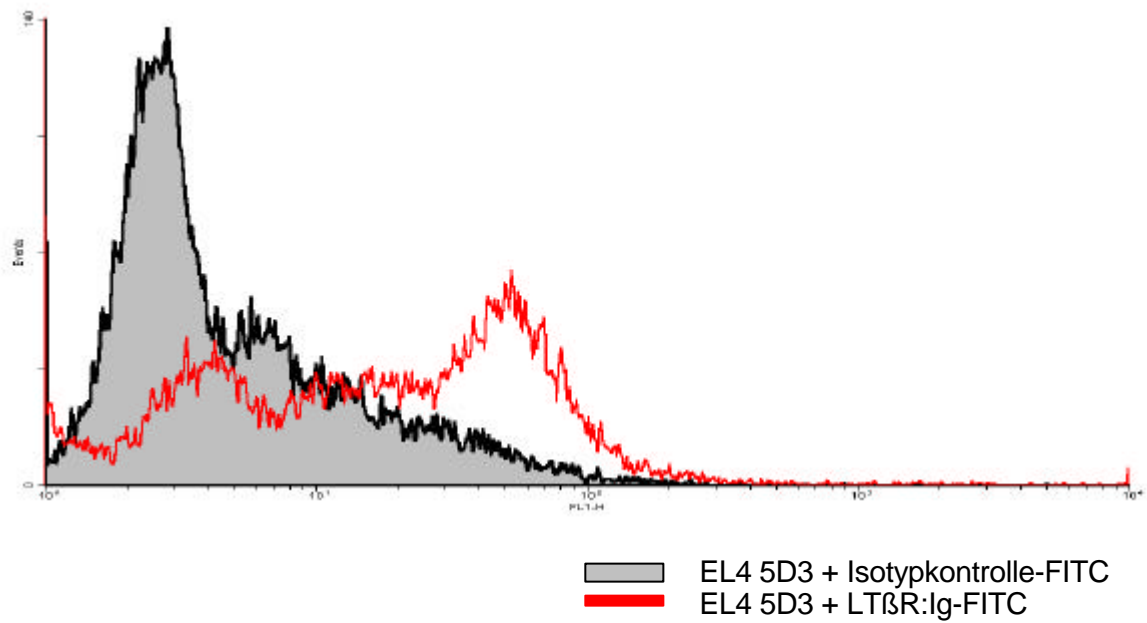
#### 4.7.4 Cokulturexperimente von BMMC mit aktivierten T-Zellen

##### 4.7.4.1 Zytokinfreisetzung aus BMMC

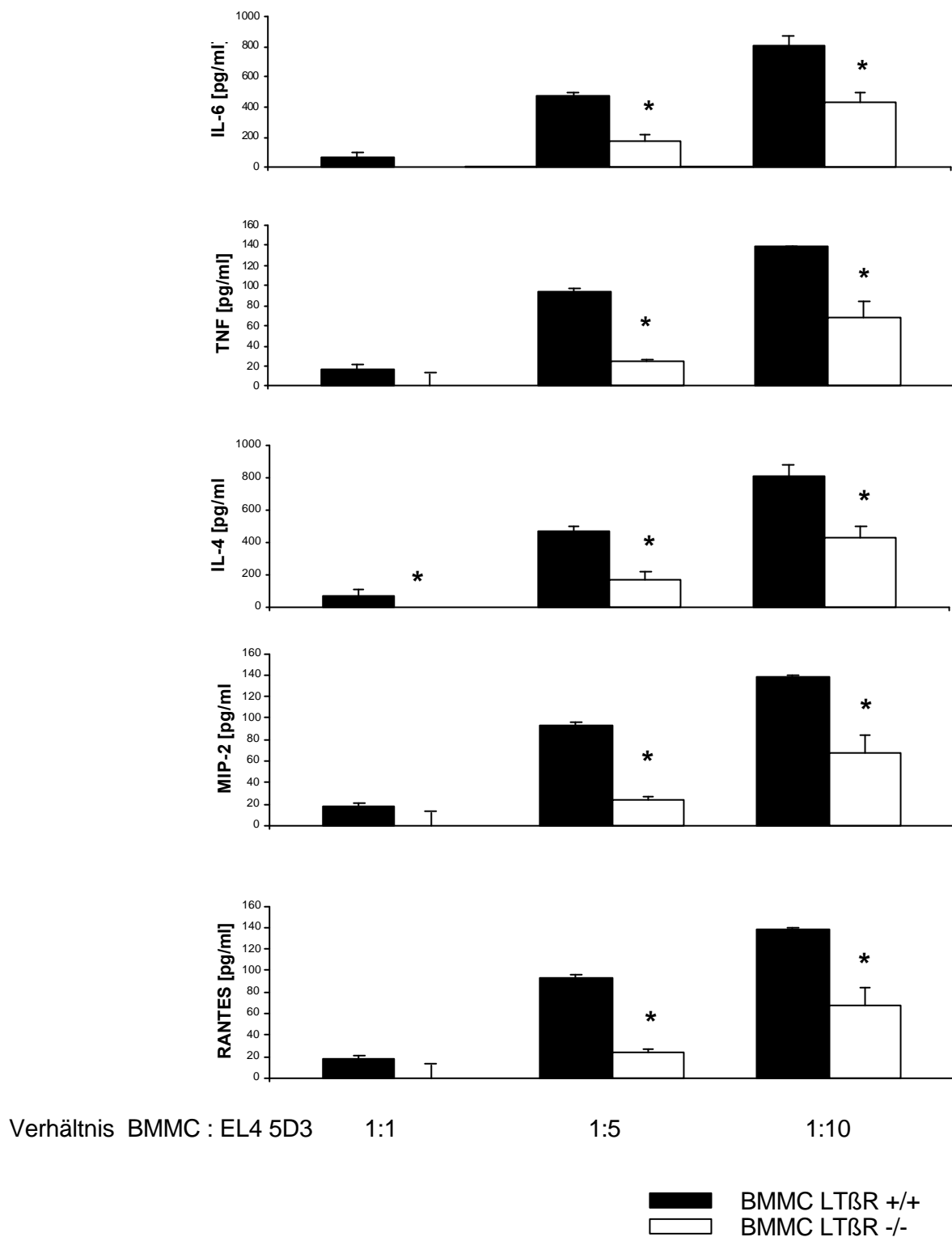
Die folgenden Experimente wurden immer in Cokultur von BMMC mit T-Zellen durchgeführt. Als T-Zellen wurden EL4 5D3, eine Maus T-Zelllinie, verwendet und zur Expression von LTα<sub>1</sub>β<sub>2</sub>/LIGHT für 14 h mit PMA und Ionomycin stimuliert (Browning, 1997). EL4 5D3 zeigten in der FACS Analyse mit LTβR:Ig-FITC zu 48% eine positive Expression der Liganden des LTβR nach 14stündiger Stimulation mit PMA und Ionomycin (Abb. 4-45 A). Die aktivierten EL4 5D3 wurden zu den BMMC, entweder aus LTβR+/+ oder LTβR -/- Mäusen, gegeben, und nach 24stündiger Cokultur wurde der Zellkulturüberstand auf die Zytokinkonzentration hin untersucht. Bei diesem Experiment wurden die aktivierten EL4 5D3 zusätzlich separat kultiviert um die Zytokinfreisetzung der aktivierten T-Zellen alleine messen zu können. Das Ausmaß an freigesetzten Zytokinen aus den separat kultivierten aktivierten EL4 5D3 wurde von den Zytokinkonzentrationen der Cokultur subtrahiert und nur die Differenz wurde in Abb. 4-45 B aufgetragen. Die aktivierten EL4 5D3 induzierten die Freisetzung von IL-4, IL-6, TNF, MIP-2 und RANTES aus den LTβR+/+ BMMC. Aber auch LTβR -/- BMMC konnten ein bestimmtes Ausmaß an Zytokinen nach Stimulierung mit aktivierten EL4 5D3 produzieren

(Abb. 4-45 B). Jedoch zeigte sich in der Zytokinfreisetzung der LT $\beta$ R+/+ gegenüber den LT $\beta$ R-/- BMMC ein signifikanter Unterschied von etwa 30-40%.

**A**



**B**

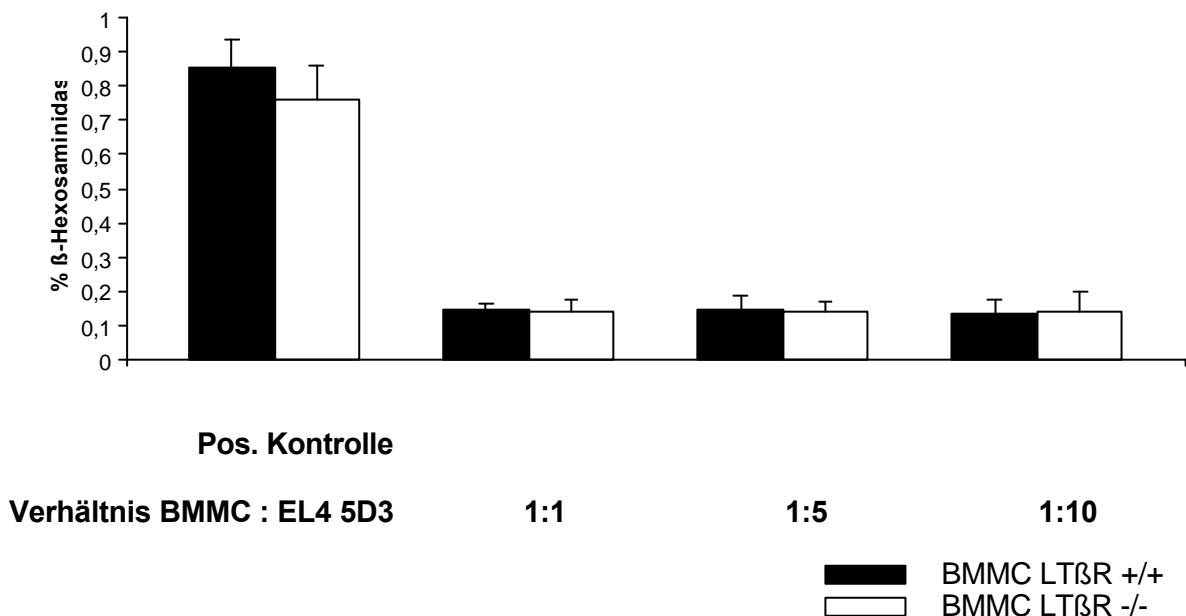


**Abbildung 4-45:**

**Zytokinfreisetzung von BMMC nach Cokultur mit aktivierten EL4 5D3.** A) FACS-Analyse von EL4 5D3, stimuliert mit je 500 ng/ml PMA und Ionomycin, auf Expression von LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT mit LT $\beta$ R:Ig-FITC. B) Zytokinfreisetzung von BMMC nach 24stündiger Cokultur mit PMA/Ionomycin aktivierten EL4 5D3. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  STABW (n=3) der gemessenen Zytokinkonzentrationen. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Statistische Signifikanz wurde mit dem Student's T-Test ermittelt.\*p<0,05

#### 4.7.4.2 Degranulation von BMMC

EL4 5D3 wurden mit PMA und Ionomycin stimuliert und anschließend mit Hilfe der Durchflußzytometrie mit LT $\beta$ R:Ig-FITC auf die Expression der Liganden des LT $\beta$ R untersucht. Dabei zeigte sich ein ähnliches Bild wie in Abb. 4-46 A. Die EL4 5D3 wurden mit BMMC, aus LT $\beta$ R+/+ oder LT $\beta$ R-/- Mäusen stammend, für 30 min kokultiviert und im Zellkulturüberstand die Konzentration an freigesetzter  $\beta$ -Hexosaminidase bestimmt. Der Vergleich an freigesetzter  $\beta$ -Hexosaminidase aus LT $\beta$ R+/+ bzw. LT $\beta$ R-/- BMMC zeigte, dass der LT $\beta$ R auf den BMMC keine Rolle bei der Degranulation der Mastzellen nach Zell-Zell Kontakt mit aktivierten T-Zellen spielt (Abb. 4-46). Der direkte Kontakt zwischen T-Zellen und BMMC führte zu keiner bedeutenden Degranulation, da nur 10% der gespeicherten  $\beta$ -Hexosaminidase freigesetzt wurde.



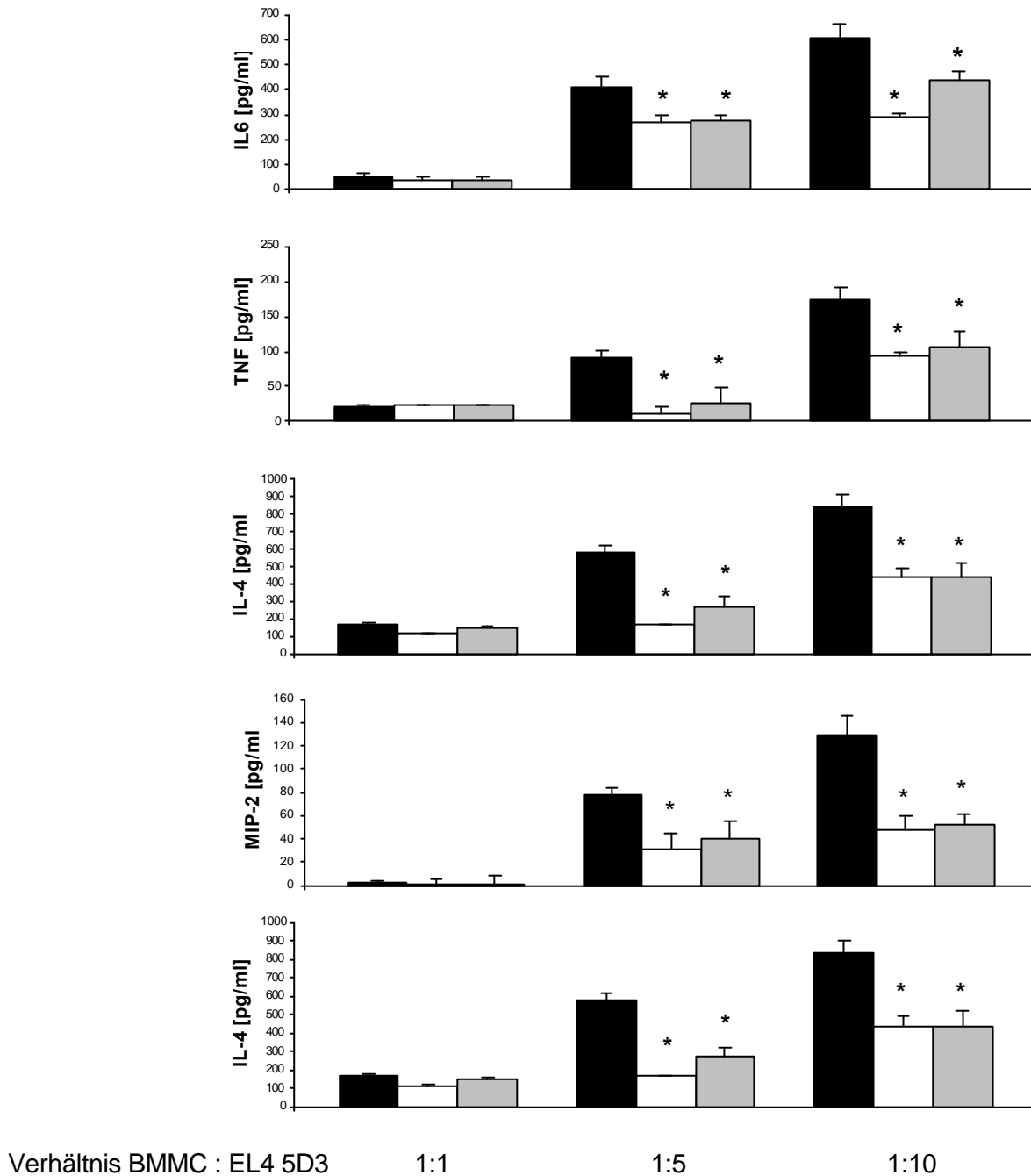
**Abbildung 4-46:**

**$\beta$ -Hexosaminidase Freisetzung von BMMC nach Kokultur mit aktivierten EL4 5D3.** BMMC, LT $\beta$ R+/+ oder LT $\beta$ R-/-, wurden mit EL4 5D3, die mit je 500ng/ml PMA und Ionomycin für 14 h stimuliert wurden, im angegebenen Verhältnis für 30 min kokultiviert und die freigesetzte  $\beta$ -Hexosaminidase im Zellkulturüberstand gemessen. Als Positivkontrolle wurden die BMMC mit je 2 $\mu$ M PMA und Ionomycin stimuliert. Angegeben ist die Freisetzung an  $\beta$ -Hexosaminidase in % vom Gesamtgehalt an gespeicherter  $\beta$ -Hexosaminidase. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  STABW (n=3). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.



### **4.7.4.3 Zytokinfreisetzung von BMMC nach Blockade von $LT\alpha_1\beta_2$ /LIGHT auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen**

EL4 5D3 Zellen wurden mit PMA und Ionomycin für 14 h stimuliert um die Expression von  $LT\alpha_1\beta_2$ /LIGHT auf der Zelloberfläche zu induzieren, und anschließend für 4h mit  $LT\beta R:Ig$  inkubiert, um das neu exprimierte  $LT\alpha_1\beta_2$ /LIGHT selektiv zu blockieren. Nach sorgfältigen Waschen der EL4 5D3 wurden diese für 24 h mit  $LT\beta R$  +/+ BMMC kokultiviert und der Zellkulturüberstand auf freigesetzte Zytokine untersucht. Parallel wurden PMA/Ionomycin aktivierte EL4 5D3, ohne  $LT\beta R:Ig$  Inkubation, mit BMMC, sowohl  $LT\beta R$ +/+ als auch  $LT\beta R$ -/-, als Kontrolle kokultiviert. Abb. 4-47 zeigt, dass aktivierte EL4 5D3, die vor der Kokultur mit  $LT\beta R$ +/+ BMMC mit  $LT\beta R:Ig$  inkubiert wurden, fast zur gleich niedrigen Zytokinfreisetzung aus BMMC führen, wie die Kokultur von aktivierten EL4 5D3 mit  $LT\beta R$ -/- BMMC.



BMMC LTβR +/+ in Cokultur mit EL4 5D3  
 BMMC LTβR -/- in Cokultur mit EL4 5D3  
 BMMC LTβR +/+ in Cokultur mit LTβR:Ig inkubierten EL4 5D3

**Abbildung 4-47:**

**Vorbehandlung von aktivierten EL4 5D3 mit LTβR:Ig vor der Cokultur mit BMMC führt zu einer verminderten Zytokinfreisetzung von BMMC.** EL4 5D3 Zellen werden für 14 h mit jeweils 500 ng/ml PMA und Ionomycin zur Expression von LTα<sub>1</sub>β<sub>2</sub>/LIGHT aktiviert. Die so aktivierten EL4 5D3 werden entweder zu LTβR+/+ (Positivkontrolle) oder LTβR-/- (Negativkontrolle) BMMC gegeben. Zusätzlich werden aktivierte EL4 5D3 für 4 h mit LTβR:Ig (20ng/ml) vorinkubiert und anschließend für 24 h mit LTβR+/+ BMMC kokultiviert. Die Zytokinkonzentrationen wurden durch spezifischen ELISAs gemessen. Angegeben sind Mittelwerte ± STABW (n=3) der Zytokinkonzentrationen. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. \*p<0,05.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Auswirkungen einer LT $\beta$ R:Ig- Behandlung bei gesunden Mäusen**

Eine fünftägige Behandlung mit LT $\beta$ R:Ig von Mäusen mit akuter bzw. chronischer DSS-induzierter Colitis wurde durchgeführt, um zu untersuchen, wie sich die Entzündungsparameter des Darmes verhalten. Bei gesunden Mäusen verursachte die Behandlung mit LT $\beta$ R:Ig im Vergleich zur Gabe von humanem IgG keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Histologie, histologischen Scoring, Gewichtsverlust, MPO-Aktivität oder Dickdarmlänge. Der histologische Score bzw. die MPO-Aktivität befanden sich auf einem sehr niedrigen Niveau, verglichen mit Werten, die bei Mäusen mit akuter bzw. chronischer Colitis gefunden wurden. Lediglich der Lymphfollikel-Score ließ eine Tendenz zur Verringerung durch LT $\beta$ R:Ig-Gabe finden, die statistisch jedoch nicht signifikant war. Auch eine verminderte IL-6-Produktion von mesenterialen Lymphozyten wurde nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung gefunden, die jedoch auch nicht signifikant war.

Etwa 20% der mesenterialen Lymphozyten gesunder Mäuse waren positiv für LT $\beta$ R-Liganden. Interessanterweise waren vor allem B-Zellen LT $\alpha_1\beta_2$ -bzw. LIGHT-positiv, was zu dem Befund passt, dass die Interaktion von LT $\alpha_1\beta_2$  auf B-Zellen mit LT $\beta$ R auf Stromazellen für die Wanderung von B-Zellen in die Lamina Propria verantwortlich ist (Newberry, 2002). Dies erklärt auch, warum eine LT $\beta$ R:Ig-Behandlung zu einer Verringerung der Zahl und Größe der Darm-Lymphfollikel führt, die im wesentlichen aus B-Zellen bestehen (Spahn, 2003).

### **5.2 Die Rolle der LT $\beta$ R- Aktivierung in der DSS- induzierten Colitis**

Mit dem Modell der DSS induzierbaren Colitis in der Maus (Okayasu, 1990), durch das entweder eine akute oder chronische Form der Colitis in Mäusen induziert werden kann, wurde die Rolle der LT $\beta$ R-Aktivierung untersucht.

#### **5.2.1 Die Rolle der LT $\beta$ R-Aktivierung in der akuten Phase der DSS-induzierten Colitis**

Die akute Phase der DSS-induzierten Colitis ist vor allem durch eine Konzentrations- und Zeit-abhängige Toxizität von DSS gegen intestinale Epithelzellen (Ni, 1996) gekennzeichnet. Normalerweise stellt das intakte Darmepithel eine relativ undurchdringliche Barriere dar; eine Verletzung der Epithelzellen durch DSS resultiert jedoch in einer Permeabilitätserhöhung. Bakterien und bakterielle Produkte können dann in die verletzte Mukosa und Submukosa einwandern und eine Entzündung auslösen, die im akuten Fall überschießen bzw. aus noch

nicht geklärten Gründen, chronisch werden kann. Dieser Vorgang der unkontrollierten Immunantwort gilt als einer der wesentlichen auslösenden Gründe für die akute DSS-induzierte Colitis. Es gibt Hinweise, dass die intestinale bakterielle Flora eine entscheidende Rolle bei der Initiation und Perpetuation entzündlicher Darmerkrankungen spielt (Sartor, 1990, 1992, 1997, 1997), und dass Colitis Ulcerosa nicht durch pathogene Organismen ausgelöst wird, sondern aus einer abnormalen Immunantwort auf einen ansonsten nicht-pathogenen Stimulus resultiert (Sartor, 1997; Sartor, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Hemmung der LT $\beta$ R-Aktivierung in der akuten DSS-induzierten Colitis zu einer signifikanten Verschlimmerung der Entzündung führte. Sowohl eine fünftägige Behandlung mit LT $\beta$ R:Ig während der Induktion der Colitis, als auch die Verwendung von LT $\beta$ R -/- Mäusen im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis, zeigten, dass gemessen an verschiedenen Parametern wie Histologie, histologischen Score, Lymphfollikel-Score, Gewichtsverlust, MPO-Aktivität und Dickdarmlänge, die Hemmung von LT $\beta$ R-Aktivierung bzw. die LT $\beta$ R-Abwesenheit mit einer verstärkten akuten Entzündungsreaktion einhergeht.

Die Verschlimmerung der Entzündung nach Hemmung der LT $\beta$ R-Aktivierung konnte besonders histologisch sehr gut festgestellt werden. Dabei wurde als Kontroll-Behandlung humanes IgG und als Positiv-Kontrolle anti-TNF-Therapie verwendet. Von der anti-TNF-Therapie war die Auswirkung in der akuten DSS-induzierten Colitis bereits bekannt. Neutralisierung von TNF erhöhte den Schweregrad der akuten Entzündung signifikant (Kojouharoff, 1997). Die schützende Wirkung in der akuten Phase einer Entzündungsreaktion, die auf inflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF beruht, zeigt sich auch darin, dass eine Hemmung der Produktion von inflammatorischen Zytokinen durch Steroide ebenfalls zu einer signifikanten Verschlimmerung der Entzündung führte (Kojouharoff, 1997). Murthy et al (1993) kamen zu ähnlichen Ergebnissen: Mäuse mit akuter DSS-induzierter Colitis wurden mit Cyclosporin A-Einläufen, behandelt was wiederum zu einer Erhöhung des Schweregrades der Colitis führte. Zusammenfassend zeigt dies die Wichtigkeit der geregelten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in der akuten Phase der Colitis.

Der vorherrschende Zelltyp bei dem akuten Entzündungsprozess sind dabei polymorphkernige neutrophile Granulozyten, die nicht nur für die Aufnahme und Zerstörung von extrazellulären Mikroorganismen, vor allem Bakterien, sondern auch für die Aktivierung anderer Zellen des Immunsystems verantwortlich sind (Domek, 1995). Ein Maß für die Neutrophileninfiltration ist die MPO-Aktivität (Bradley, 1982). Wie die erhöhte MPO-Aktivität in Darmbiopsien von Mäusen mit akuter Colitis verglichen mit gesunden Mäusen zeigt, ist die Neutrophileninfiltration in das Dickdarmgewebe ein charakteristisches Merkmal der DSS-induzierten akuten Colitis bei der Maus. Sowohl durch eine Behandlung mit LT $\beta$ R:Ig wie mit

anti-TNF konnte eine signifikante Zunahme der MPO-Aktivität beobachtet werden, was die Ergebnisse der Histologie bestätigte.

Die Wichtigkeit der neutrophilen Granulozyten in der akuten Phase der Colitis zeigt sich darin, dass sich auch in SCID Mäusen, denen reife T- und B-Zellen fehlen, eine DSS-induzierte akute Colitis entwickelt (Dieleman, 1994; Axelsson, 1996). Im distalen Dickdarm von Mäusen mit akuter DSS-induzierter Colitis wurde auch keine vermehrte Expression von  $LT\alpha/LT\beta/LIGHT$ , was normalerweise für aktivierte T- und B-Zellen charakteristisch ist, im Vergleich zu gesunden Mäusen gefunden (Agyekum, 2003; Browning, 1995; Browning, 1997; Gramaglia, 1999).

Die Expression von  $LT\beta R$  scheint während der akuten Phase der Colitis ebenfalls nicht reguliert zu sein. Dies stimmt mit Daten aus der Literatur überein, wo der Einfluss von  $IFN\gamma$  auf die  $LT\beta R$ -Expression in WI38VA13-Zellen (humane Fibroblastenzelllinie), A375 (humane Melanomzelllinie) und U937 (humane monozytäre Zelllinie) getestet wurde. Dabei konnte keine Beeinflussung der  $LT\beta R$ -Expression festgestellt werden, was auf eine konstitutive Expression von  $LT\beta R$  hinweist (Degli-Esposti, 1997).

Die regulierte Immunantwort gegen die durch DSS-Gabe hervorgerufene Entzündung ist wichtig, um den Organismus gegen Translokation von Bakterien und bakterielle Produkte zu schützen. In anderen Colitis-Modellen (Mackay, 1998; Dohi, 2001; Spahn, 2002), wie auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Wichtigkeit des TNFR- und des  $LT\beta R/LT$ -Liganden-Systems an Entzündungsreaktionen im Darm gezeigt. Dabei hemmt die Neutralisierung von TNF in der akuten DSS-induzierten Colitis die Entzündungsreaktion und damit die antibakterielle Immunantwort direkt. Demgegenüber beeinflusst die Blockade der  $LT\beta R$ -Aktivierung die Immunantwort eher indirekt, nämlich durch eine Erhöhung der Entzündungsreaktion.

Ein wichtiger Teil der Regulation der Immunantwort im Dickdarm findet in den Lymphfollikeln der Dickdarmmukosa („colonic patches“) statt. Durch Gabe von  $LT\beta R:Ig$  während der akuten Phase der Colitis konnte eine Erhöhung des Lymphfollikel-Scores und auch eine Vergrößerung der Lymphfollikel im Dickdarm festgestellt werden. In  $LT\beta R^{-/-}$  Mäusen wurde dieses Ergebnis bestätigt: Auch hier zeigte sich ein signifikant erhöhter Lymphknoten Score verglichen zu WT Mäusen mit akuter DSS-induzierter Colitis. Dies lässt vermuten, dass es in der Mucosa einen  $LT/LT\beta R$ -unabhängigen Weg zur Bildung von lymphoiden Strukturen geben muss, der vor allem bei der akuten intestinalen Entzündung zum Tragen kommt. Bisher waren in Mäusen mit defektem  $LT/LT\beta R$ -System funktionelle Störungen in der Ausbildung bzw. Aufrechterhaltung von sekundären lymphatischen Organen beobachtet worden, was sich in einer reduzierten Entwicklung von Lymphknoten, zerstörter Struktur der Milz und der Keimzentren, die Abwesenheit von FDC-Netzwerken und gestörten Antikörper-

Antworten zeigte (Mackay, 1997; Futterer, 1998; Banks, 1995; Koni, 1997; Endres, 1999; Ettinger, 1996; Mackay, 1998; Rennert, 1998).

Während die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entstanden, wurde ebenfalls eine Verstärkung der Entzündung während der akuten Colitis in Mäusen mit gestörtem LT-System in zwei verschiedenen Modellen gezeigt (Spahn, 2002; Dohi, 2001). Im ersten wurde auch das Modell der akuten DSS-induzierten Colitis an  $LT\alpha$   $-/-$  Mäusen bzw. Mäusen, die *in utero* mit  $LT\beta R:Ig$  behandelt wurden, verwendet. Bei diesen Mäusen entwickeln sich, im gesunden Zustand, keine Peyer's Patches bzw. mesenteriale Lymphknoten. In der akuten Phase der Colitis wurde jedoch eine signifikante Verschlimmerung der Entzündung und auch eine vermehrte Bildung von colonic patches beobachtet. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, dass das Vorhandensein von organisiertem intestinalem Lymphgewebe vor dem Auslösen der Colitis einer Verschlimmerung der Colitis entgegenwirkt, wohingegen die *de novo* geformten lymphoiden Strukturen die Ausbildung der Entzündung eher vorantreiben. Dies wird durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt, da in  $LT\beta R$   $-/-$ , die keine mesenterialen Lymphknoten besitzen, eine Verschlimmerung der Entzündung während der akuten Phase der DSS-induzierten Colitis und eine erhöhte Anzahl von colonic patches gefunden wurde. Dies ist besonders interessant, weil die neu gebildeten Lymphfollikel im Dickdarm vor allem aus B-Zellen bestehen (Spahn 2002). In der vorliegenden Arbeit als auch von Agyekum et al (2003) wurde jedoch gezeigt, dass es vor allem B-Zellen sind, die  $LT\alpha_1\beta_2/LIGHT$  exprimieren. Da jedoch die Interaktion von B-Zellen über  $LT\alpha_1\beta_2$  mit  $LT\beta R$  auf Stromazellen für die Wanderung von B-Zellen in die Lamina Propria verantwortlich gemacht werden (Newberry, 2002), ist der Mechanismus, durch den die B-Zellen während der akuten Entzündung zur Bildung von vergrößerten lymphoiden Strukturen in der Lamina Propria führen, noch völlig unklar.

In einem zweiten Modell wurde die durch TNBS-induzierte Colitis in Mäusen ohne colonic patches untersucht. Dabei wurden Mäuse *in utero* mit  $LT\beta R:Ig$  vorbehandelt, was zu einer Rückbildung der Lymphfollikel im Dickdarm führte. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit wurde jedoch in der TNBS-induzierten Colitis kein vermehrtes Auftreten von colonic patches gefunden. Dieser Unterschied kann am experimentellen Modell der TNBS-induzierten Colitis liegen, welches eher eine klassische Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ ist, was den Vergleich des TNBS-Modells mit anderen Colitis-Modellen erschwert. Mäuse ohne Lymphfollikel im Dickdarm hatten jedoch ebenfalls ein signifikant vermehrtes entzündliches Infiltrat während der TNBS-induzierten Colitis, das vor allem aus polymorphkernigen Leukozyten bestand. Dies erhärtet die Theorie, dass sich eine intestinale Entzündung, entweder in Folge einer DSS- oder einer TNBS-Gabe, in der Abwesenheit von normal strukturierten sekundären lymphatischen Strukturen viel heftiger entwickelt.

Dies wird auch durch die Daten der quantitativen PCR gestützt, die eine vermehrte Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF nach der Behandlung der akuten DSS-induzierten Colitis mit LT $\beta$ R:Ig aufzeigt. Auch in LT $\beta$ R-/- Mäusen wurde ein vermehrtes Auftreten von IL-6 mRNA in der akuten Phase der Colitis beobachtet. Dies deutet auf eine ungenügende Gegenregulation der mukosalen Entzündung durch die Hemmung der LT $\beta$ R-Aktivierung hin. Zusätzlich wurden auch erhöhte Werte an IL-6, TNF und MIP-2 im Zellkulturüberstand von mesenterialen Lymphozyten, die aus LT $\beta$ R:Ig behandelten Mäusen stammten, gefunden.

Die *de novo* Bildung von colonic patches, die durch eine DSS-induzierte Entzündung hervorgerufen bzw. verstärkt wurde, ist, wie bereits oben beschrieben, vom LT $\beta$ R/LT-Liganden System unabhängig. Demgegenüber scheint es, dass intakt organisierte intestinale lymphoide Strukturen fähig sind, die Heftigkeit der Entzündung abzuschwächen, da in WT bzw. unbehandelten Mäusen mit akuter Colitis die Entzündung jeweils signifikant reduziert war.

Die Wechselwirkung von Zellen, die normal in den mukosalen lymphoiden Strukturen vorhanden sind, scheinen diese Antwort auf eine intestinale Entzündung zu steuern. Vor allem Makrophagen und dendritische Zellen erfüllen diese Aufgabe. Beide Zelltypen sind für das LT $\beta$ R/LT-Liganden System von besonderer Bedeutung (Browning, 1997; Dohi, 2001; eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Besonders dendritische Zellen sind eine wichtige Quelle für IL-10 (Iwasaki, 1999), das als antiinflammatorisches Zytokin bekannt ist. Die durch Interaktion zwischen LT $\alpha_1\beta_2$  und LT $\beta$ R induzierte Chemokinproduktion ist für die Besiedlung von sekundären lymphoiden Organen mit dendritischen Zellen absolut notwendig (Abe, 2003). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Behandlung mit LT $\beta$ R:Ig die Anzahl von dendritischen Zellen in Peyer's Patches verringert (Dohi, 2001). Außerdem ist seit einigen Jahren bekannt, dass Gabe von LT $\beta$ R:Ig die Strukturen von FDC in der Milz und in Lymphknoten zurückbilden kann (Endres, 1999; Mabbott, 2000; Mackay, 1998; Murphy, 1998; Prinz, 2002; Wang, 2001). Das Überschiessen der Entzündung während der akuten Phase der DSS-induzierten Colitis wird zum Teil auf einen Toleranz-Verlust gegenüber der normalen Darmflora zurückgeführt, als Folge des Fehlens von normalerweise in colonic patches anwesenden regulatorisch wirkenden Zellen. Ein Toleranz-Verlust gegenüber Protein aus dem Darmlumen nach Behandlung mit LT $\beta$ R:Ig *in utero* wurde bereits in einer Publikation beschrieben (Fujihashi, 2001).

Dies erklärt warum die Blockade der LT $\beta$ R-Aktivierung einen gänzlich anderen Wirkmechanismus zeigt als die Neutralisierung von TNF. Die Verstärkung der Entzündung der akuten DSS-induzierten Colitis nach anti-TNF-Behandlung ist auf das Unvermögen, eine protektive entzündliche Reaktion gegen in die Mukosa eindringenden Bakterien einzuleiten, zurückzuführen. Im Gegensatz dazu basiert die überschießende Entzündungsreaktion in der akuten Phase der Colitis nach LT $\beta$ R-Blockade nicht auf einer direkten Hemmung einer

entzündlichen Reaktion, sondern greift in die Regulation der sekundären lymphatischen Organe des Darmes ein. Dadurch wird eine kontrollierte Reaktion gegen eindringende Bakterien bzw. bakteriellen Bestandteile nicht mehr möglich und es kommt zum Überschießen der Entzündung mit entsprechender Gewebszerstörung.

### **5.2.2 Die Rolle der LT $\beta$ R-Aktivierung in der chronischen Phase der DSS-induzierten Colitis**

Die chronische DSS-induzierte Colitis unterscheidet sich in ihrer Manifestation von der akuten Form in vielerlei Hinsicht. Sie ist nicht direkt von Bakterien bzw. bakteriellen Bestandteilen, die aus dem Darmlumen in die Mukosa eindringen, abhängig. Vielmehr zeigt sich in der chronischen Phase der DSS-induzierten Colitis ein weitgehend regeneriertes Epithel, das eine funktionierende Barriere für die Bakterien im Darmlumen darstellt. Darüber hinaus besteht das entzündliche Infiltrat in großem Maße aus T-Zellen und nur zu einem geringen Teil aus neutrophilen Granulozyten. Die Chronizität der Colitis äußert sich dadurch, dass die T-Zellen unabhängig von Antigen aus dem Darmlumen aktiviert werden.

Behandlung von Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis mit LT $\beta$ R:Ig hatte eine Reduktion der Entzündung zur Folge. Dieser Effekt war einer anti-TNF-Therapie vergleichbar, die in der chronischen Form der Colitis ebenfalls die Entzündung im Dickdarm vermindert (Powrie, 1994; Neurath, 1997; Present, 1999; Kojouharoff, 1997).

Ebenso zeigte sich in LT $\beta$ R-/- Mäusen, denen eine chronische Colitis induziert wurde, eine verminderte Entzündung im Vergleich zu WT Mäusen. Dies konnte durch die Parameter wie Histologie, histologischer Score, Lymphfollikel-Score, MPO-Aktivität und Dickdarmlänge belegt werden. Dabei erreichten die Dickdarmlängen der LT $\beta$ R:Ig behandelten Tiere mit chronischer Colitis fast schon wieder die Länge von gesunden Mäusen. Da es sich bei der chronischen DSS-induzierten Colitis um eine T-Zell-abhängige Krankheit handelt, konnte nur ein geringes Ausmaß an MPO-Aktivität in den Dickdarmbiopsien gemessen werden, die durch Gabe von LT $\beta$ R:Ig bzw. anti-TNF-Behandlung noch verringert wurde.

Bei der Bestimmung des Lymphkfollikel-Scores zeigte sich ein wichtiger Unterschied zwischen der LT $\beta$ R:Ig-Behandlung und der anti-TNF-Gabe. Während die Behandlung mit LT $\beta$ R:Ig den Lymphfollikel-Score signifikant vermindern konnte, war bei der anti-TNF-Behandlung kein Effekt in Vergleich zur mit humanen IgG behandelten Gruppe feststellbar. In LT $\beta$ R-/- Mäusen mit chronischer Colitis wurden keine lymphoiden Strukturen in der Dickdarmmukosa beobachtet. Dieses Ergebnis stellt die umgekehrte Situation im Vergleich zur akuten Form der Colitis dar, wo eine Erhöhung des Lymphfollikel-Scores durch LT $\beta$ R:Ig-Behandlung gemessen wurde. Während es bei akuten Entzündungen des Dickdarms einen LT $\beta$ R/LT-Liganden unabhängigen Weg zur Bildung von sekundären lymphatischen Organen zu geben scheint, ist in der chronischen Form der Colitis die Bildung von lymphoiden



Strukturen in hohem Maße von der Interaktion von  $LT\alpha_1\beta_2$  mit  $LT\beta R$  abhängig. Eine ähnliche Wirkung kann man in der gesunden Maus erkennen, in der durch  $LT\beta R$ :Ig-Gabe der Lymphfollikel-Score zwar nicht signifikant, aber doch tendenziell vermindert wurde. Dies wird auch durch Daten in der Literatur unterstützt: Es ist bekannt, dass für die Organogenese von Lymphknoten die Chemokine BLC, ELC und SLC eine essentielle Rolle spielen (Honda, 2001) und, dass  $LT\alpha_1\beta_2$  wichtig für die Regulation der BLC-, ELC- und SLC-Expression im lymphatischen Gewebe ist (Ngo, 1999). Eine weitere Arbeit wies einen Regelkreis zwischen  $LT\alpha_1\beta_2$ / $LT\beta R$  und BLC-Expression mit positiver Rückkopplung nach (Ansel, 2000). Dieser Regelkreis sorgt dafür, dass zirkulierende B-Zellen durch BLC in Richtung der B-Zellfollikel gelockt werden. Gleichzeitig wird die  $LT\alpha_1\beta_2$ -Expression dieser B-Zellen durch BLC gesteigert. BLC selbst wird durch  $LT\beta R$ -Aktivierung auf FDC durch aktivierte B-Zellen produziert. Diese positive Rückkopplung ermöglicht im während einer Immunantwort eine rasche Expansion des follikulären Kompartiments. Derselbe Mechanismus wirkt vermutlich auch bei der Bildung von Lymphknoten und Peyer's Patches, wo B-Zellen aus der Umgebung durch BLC angelockt werden (Luther, 2000).

Die Expression von ELC und SLC ist für die Rekrutierung von naiven T-Zellen zuständig. SLC ist vor allem auf Gefäßen mit hohem Endothel in Lymphknoten und Peyer's Patches zu finden (Gunn, 1998; Hedrick, 1997; Tabane, 1997), wohingegen ELC von dendritischen Zellen der T-Zell-Zone gebildet wird (Ngo, 1998). Die Abhängigkeit der SLC- und BLC-Produktion von  $LT\alpha_1\beta_2$  wurde auch durch Hjelmstrom et al (2000) bestätigt. Durch Blockade der  $LT\beta R$ -Aktivierung, wird der oben beschriebene Weg unterbrochen und die Ausbildung von lymphatischen Strukturen wird unterbunden. Das vollständige Fehlen von colonic patches in Dickdärmen von  $LT\beta R$ -/- Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis unterstreicht die Abhängigkeit der Neuanlage von lymphoiden Strukturen von der  $LT\beta R$ -Aktivierung. Da auch TNF einen Einfluss auf die BLC- und ELC-Produktion hat, war es verwunderlich, dass nach Behandlung von Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis keine Verringerung der Anzahl von Lymphfollikel im Dickdarm festzustellen war.

Die angesprochenen Chemokine stellen die Verbindung zwischen der embryonalen Lymphogenese und chronischer Entzündung bzw. Autoimmunerkrankung dar (Sacca, 1995). So wurden beispielsweise im Thymus von Patienten mit Myasthenia Gravis Lymphfollikel und Keimzentren gefunden (Mooij, 1993). Ähnliche Strukturen wurden auch in den Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis beobachtet (Canella, 1990). Im Typ I Diabetes-Mausmodell ging der Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas die Ausbildung von Lymphfollikeln voraus (Faveeuw, 1994). Hieraus lässt sich erkennen, dass chronische Entzündung bzw. Autoimmunerkrankungen mit lymphoider Neogenese einhergeht.

Die Entzündung während der chronischen DSS-induzierten Colitis wird von erhöhten mRNA Werten der inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF begleitet. Demgegenüber war

das Niveau der mRNA-Werte für IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung signifikant verringert, was einen viel niedrigeren Grad der Entzündung in den Dickdärmen der LT $\beta$ R:Ig behandelten Mäuse anzeigt. Auch mesenteriale Lymphozyten von LT $\beta$ R:Ig behandelten Mäusen mit chronischer Colitis produzierten geringere Mengen IL-6, TNF und MIP-2, im Vergleich mit jenen aus Kontroll-Mäusen. Dies zeigt, dass die Lymphozyten der LT $\beta$ R:Ig-Gruppe weniger aktiviert waren, was auf die Rückbildung von dendritischen Zellen bzw. von FDC nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung zurückzuführen ist (Dohi, 2001; Endres, 1999; Mabbott, 2000; Mackay, 1998; Murphy, 1998; Prinz, 2002; Wang, 2001).

Möglicherweise verändern aktivierte Lymphozyten über LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT-Interaktion mit LT $\beta$ R-tragenden Zellen die Produktion regulatorischer Faktoren wie z.B. von Chemokinen oder Adhäsionsmolekülen. Auch in zwei anderen, T-Zell-Transfer-abhängigen Colitis-Modellen verringerte LT $\beta$ R:Ig-Behandlung die Symptome. Dabei handelte es sich um das CD45RB<sup>high</sup> Modell, in dem SCID Mäuse mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen rekonstituiert wurden und im zweiten Modell wurden T-Zellvorläufer in T-Zell/NK-Zell-defiziente tg $\epsilon$ 26 Mäuse transferiert. Dies demonstriert, dass LT $\beta$ R:Ig-Behandlung auch eine entscheidende Rolle bei T-Zell-vermittelten Funktionen spielt (Mackay, 1998). Aufgrund dieser Daten lässt sich folgern, dass LT $\beta$ R-Aktivierung den Verteilungs-Prozess von Lymphozyten beeinflusst, vor allem in Mukosa-assoziierten lymphoiden Gewebe.

Während der chronischen DSS-induzierten Colitis war mRNA für LT $\beta$ , dem Hauptbestandteil von LT $\alpha_1\beta_2$ , hochreguliert. Auch in Biopsien von Patienten mit CED wurde eine erhöhte Expression von LT $\beta$  auf CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten und Plasmazellen gefunden (Agyekum, 2003). Zusätzlich wurden vermehrt die Liganden des LT $\beta$ R auf CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und B220<sup>+</sup> Zellen aus mesenterialen Lymphknoten von Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis gefunden. Da dies durch Bindung von LT $\beta$ R:Ig-FITC gezeigt wurde, ist es nicht möglich zwischen LT $\alpha_1\beta_2$  und LIGHT zu unterscheiden. Im Anbetracht der PCR-Daten ist anzunehmen, dass es sich dabei vor allem um das vermehrte Auftreten von LT $\alpha_1\beta_2$  handelt. An mesenterialen Lymphozyten wurde eine Steigerung der LT $\beta$ R-Liganden-Bindung um etwa 50% festgestellt. Dabei verdoppelte sich die LT $\beta$ R-Ligand Expression auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen, bei B220<sup>+</sup> Zellen stieg sie in etwa um 35%. Vor allem die Induzierbarkeit der Ligandenmoleküle LT $\alpha$  und LT $\beta$  wurde in der Literatur beschrieben (Browning, 1991; Millet, 1994; Pauli, 1994). Auch auf durch OKT3/IL-2-aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen konnten die Ligandenmoleküle nachgewiesen werden (Ohshima, 1999; Ware, 1992 und 1995; Mapara, 1994; Abe, 1992; Yasukawa, 1993), wobei auf aktivierten T-Zellen LT $\alpha_1\beta_2$  die vorherrschende Form darstellt (Androlewicz, 1992; Browning, 1995). Auch periphere naive T-Zellen exprimieren nach Peptid/MHC-Aktivierung des T-Zellrezeptors ohne weitere Costimulation LT $\alpha/\beta$  (Gramaglia, 1999). Eine Beteiligung von NF $\kappa$ -B und Ets-Transkriptionsfaktoren wurde für die PMA-Induktion von LT $\beta$  beschrieben (Pokholok, 1995;

Kuprash, 1996). Es zeigt sich generell durch das verstärkte Vorkommen von LT $\beta$  in der chronischen Colitis die Abhängigkeit dieser Krankheit von aktivierten T-Zellen. Das Ausmaß an LT $\beta$  auf T-Zellen korreliert mit dem Ausmaß der Entzündung bei CED.

Dagegen konnte keine vermehrte LIGHT-Expression in Dickdarm von Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis gefunden werden. Daher scheint es, dass LIGHT einen geringeren Anteil als LT $\beta$  an der Entwicklung und Manifestation der chronischen Colitis hat. Dieses Ergebnis ist wichtig, da LIGHT als costimulatorisches Molekül für T-Zell-Aktivierung beschrieben wurde. In der gleichen Publikation wurde durch LIGHT-Überexpression in Mäusen eine spontane Entwicklung einer intestinalen Entzündung beobachtet (Wang, 2001). Im Modell der DSS-induzierten Colitis scheint LIGHT jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen.

In Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis wurde nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung weniger MadCAM-1 gefunden. Auch in LT $\beta$ R-/- Mäusen, die eine chronische Colitis entwickelt hatten, konnte nur wenig MadCAM-1 festgestellt werden. Dies bestätigt Ergebnisse, dass die MadCAM-1-Expression in der Milz von der LT $\beta$ R-Aktivierung abhängig ist (Mackay, 1997; Gonzales, 1998; Alimzhanov, 1997). Eine reduzierte MadCAM-1-Expression nach LT $\beta$ R:Ig-Gabe, wurde auch in Peyer's Patches (Debard, 2001) und in cervikalen Lymphknoten (Rennert, 1997) gefunden. Dagegen war nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung PNAd im Dickdarm von Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis nicht vermindert. Es gibt jedoch Berichte, wonach PNAd-Expression abhängig von LT $\beta$ R-Aktivierung in verschiedenen Geweben unterschiedlich reguliert zu sein scheint (Cuff, 1998; Cuff, 1999).

Sowohl im CD45RB<sup>high</sup> T-Zell-Transfer-Modell (Picarella, 1997) als auch in der chronischen DSS-induzierten Colitis (Kato, 2000) wurde gezeigt, dass MadCAM-1 entscheidend an der Ausbildung der Colitis beteiligt ist. Adhäsionsmoleküle, wie MadCAM-1, regulieren den Influx von Lymphozyten in den gesunden bzw. entzündeten Darm. Vor allem MadCAM-1 ist spezifisch für das gastrointestinale Endothel. Jedoch werden auch Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 und PNAd in der intestinalen Mukosa gefunden (VanAsche, 2002; Farkas, 2001; Connor, 1999). Adhäsionsmoleküle sind auch an der lokalen Lymphozytenstimulation und Antigenpräsentation in der intestinalen Mukosa beteiligt (VanAsche, 2002). Daher verwundert es nicht, dass die Hemmung von Adhäsionsmolekülen wie z.B. MadCAM-1, zu einer eindeutigen Reduktion der Entzündung in experimentellen Colitis-Modellen führte (VanAsche, 2002), was auch für das chronische DSS-induzierte Modell gilt (Kato, 2000). Weiterhin zeigte die Neutralisation von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, dem MadCAM-1 Liganden, oder von  $\alpha_4$ -Integrin alleine eine signifikante Milderung der Colitis (VanAsche, 2002; Watanabe, 2002), was die wichtige Rolle von MadCAM-1 in der Entwicklung der Colitis weiter unterstreicht.

Um die Lymphozyten-Endothel Wechselwirkungen und die Lymphozyten Auswanderung in die Mukosa und Submukosa während der chronischen intestinalen Entzündung

quantifizieren zu können, wurde daher die Methode der *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie benutzt (Farkas, 2001). Durch Verwendung dieser Methode wurde deutlich, dass eine durch LT $\beta$ R:Ig hervorgerufene reduzierte MadCAM-1-Expression mit signifikant geringerem Rollen und Anhaften von Lymphozyten am intestinalen Endothel einhergeht. Darüber hinaus wurde verminderte Extravasation von Lymphozyten in die entzündete Mukosa gefunden. Es gibt neben MadCAM-1 jedoch noch andere Adhäsionsmoleküle wie z.B. ICAM-1, VCAM-1 und PNAd, die während der chronischen Colitis vermehrt gebildet werden, deren Expression jedoch nicht über Aktivierung des LT $\beta$ R gesteuert ist. Die Expression dieser Adhäsionsmoleküle ist höchstwahrscheinlich der Grund dafür, dass nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung immer noch Rollen, Anhaften und Extravasation von Lymphozyten, wenn auch in vermindertem Maße, in der *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie gesehen werden konnte. Für MadCAM-1 und VCAM-1 wurde eine gewisse Heterogenität im Expressionsmuster gefunden, wobei MadCAM-1 vor allem für die Direktion von Lymphozyten in die Lamina Propria verantwortlich ist und VCAM-1 die Verteilung von Lymphozyten in die Submucosa regelt (Watanabe, 2002). Es gibt jedoch keinen Zweifel daran, dass MadCAM-1 eine dominierende Rolle für die Direktion von Lymphozyten in die Dickdarmmukosa hat.

Die Auswirkungen einer IFN $\gamma$ -Neutralisation in Kombination mit LT $\beta$ R:Ig-Gabe wurde ebenfalls untersucht. Neutralisierung von IFN $\gamma$  in der chronischen DSS-induzierten Colitis verursacht eine signifikante Milderung der Erkrankung (Obermeier, 1999). In einem Modell der TNBS-induzierten Colitis mit LT $\beta$ R:Ig *in utero*-vorbehandelten Mäusen, bewirkte IFN $\gamma$ -Neutralisation eine signifikante Verbesserung der Symptome. In diesem Modell konnte LT $\beta$ R:Ig-Gabe nur durch zusätzliche anti-IFN $\gamma$ -Therapie zu einer Verbesserung der Krankheit führen (Dohi, 2001). Im Gegensatz dazu vermindert die alleinige LT $\beta$ R:Ig-Gabe im Modell der chronischen DSS-induzierten Colitis die Entzündung. Im diesem Modell verbesserte eine Kombinationstherapie mit anti-IFN $\gamma$  und LT $\beta$ R:Ig die Entzündung signifikant, und war den Monotherapien signifikant überlegen. Während die Neutralisation von IFN $\gamma$  direkt die entzündliche Reaktion reduziert, in einer ähnlichen Weise wie die anti-TNF-Therapie, verhindert LT $\beta$ R:Ig-Gabe die T-Zell-vermittelte Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung. Daher scheint es, dass beide Behandlungsstrategien unabhängig voneinander durch die Beeinflussung von verschiedenen molekularen Mechanismen, die am Vorantreiben der pathologischen Situation der chronischen DSS-induzierten Colitis beteiligt sind, wirken. Allgemein könnte man erwarten, dass jede Kombinationsbehandlung bestehend aus einer direkten anti-inflammatorischen Komponente und einer Blockade der LT $\beta$ R-Aktivierung einen additiven positiven Effekt auf die chronische DSS-induzierte Colitis bewirkt.

Die Blockade des LT $\beta$ R/LT-Liganden-Systems stellt daher eine attraktive Alternative zur Hemmung des TNFR/TNF-Systems dar. LT $\beta$ R:Ig-Behandlung führt zu einer verminderten

Manifestation der chronischen DSS-induzierten Colitis, indem die MadCAM-1-Expression vermindert und dadurch Lymphozyten-Extravasation verhindert wird.

### 5.3 Expression und Funktionalität des LT $\beta$ R auf BMMC

Auf RNA- und Protein-Ebene wurde deutlich, dass Mastzellen den LT $\beta$ R auf der Zelloberfläche tragen, wobei die Identität und Reinheit der BMMC abgesichert war. LT $\beta$ R-Defizienz hatte keinen grundlegenden Einfluss auf das Ausdifferenzieren von Knochenmarkstammzellen zu Mastzellen. Lediglich nach vierwöchiger Kultur der BMMC war eine geringere CD117-Expression von LT $\beta$ R $^{-/-}$  BMMC im Vergleich zu LT $\beta$ R $^{+/+}$  BMMC sichtbar, was jedoch nach sechswöchiger Kultur der BMMC ausgeglichen war.

LT $\beta$ R mRNA wurde in der Leber, Lunge, Niere, Herzen, Milz und Lymphknoten der Maus konstitutiv nachgewiesen (Force, 1995; Nakamura, 1995), jedoch weder in T- noch auf B-Zellen gefunden. Diese Ergebnisse wurden in einer neueren Arbeit bestätigt, wobei zusätzlich auch LT $\beta$ R mRNA in der Haut, Muskel, Knochen, Magen, Dünn- und Dickdarm, Thymus, Eierstöcken und Uterus nachgewiesen wurde (Browning, 2002). Dabei waren epitheliale Zellen LT $\beta$ R-positiv, was am Beispiel von Epithelzellen aus dem Dünn- und Dickdarm vor allem während der Embryonalphase gezeigt wurde. Eine weitere Arbeit (Murphy, 1998) zeigt LT $\beta$ R-Expression in Stromazellen im sich entwickelnden humanen Thymus, auf reticulär dendritischen Zellen des Thymus und der Milz vor allem in der weißen Pulpa. Der LT $\beta$ R wurde in mehreren Publikationen auf FDC nachgewiesen (Endres, 1999; Mabbott, 2000; Mackay, 1998; Murphy, 1998; Prinz, 2002; Wang, 2001). Auch auf einigen Zellen hämatopoetischen Ursprungs, z.B. auf Zellen der monozytären Zelllinie RAW (Force, 1995) und auf peritoneal Maus-Makrophagen wurde LT $\beta$ R-Expression gefunden (Browning, 1997). Das beschriebene Expressionsmuster zeigt jedoch, dass LT $\beta$ R hauptsächlich auf Zellen, die nicht hämatopoetischen Ursprungs sind, vorhanden ist. Daher gehören Mastzellen neben mononukleären Zellen zu den wenigen Zelltypen, die hämatopoetischen Ursprungs und LT $\beta$ R-positiv sind.

LT $\beta$ R $^{-/-}$  bzw. LT $\beta$ R $^{+/+}$  BMMC waren mit Ionomycin gleichermaßen stimulierbar. Die Aktivierung des LT $\beta$ R auf BMMC entweder durch agonistische monoklonale Antikörper oder durch mLIGHT in Gegenwart von Ionomycin führte zur erhöhten Freisetzung von IL-4, IL-6, TNF, MIP-2 und RANTES. Unter den gleichen Stimulationsbedingungen wurde jedoch keine LT $\beta$ R-spezifische Degranulation der BMMC gefunden. Da nur in der Anwesenheit von Ionomycin und den entsprechenden spezifischen LT $\beta$ R-Stimulatoren Zytokinfreisetzung beobachtet wurde, scheint ein Ca-abhängiges Cosignal für die Zytokinsekretion notwendig zu sein. Das in diesem experimentellen Modell zur Auslösung des Ca-Signals verwendete Ionomycin dürfte *in vivo* vor allem durch Signale über den Fc $\epsilon$ RI, IL-3R bzw. CD117 geliefert werden (Hohmann, 1993). Die Verwendung von Ionomycin als Costimulator bei

Zytokinfreisetzungs-Experimenten bei BMMC stellt jedoch ein etabliertes Versuchs-Modell dar (Stassen, 2001; Stassen, 2001; Hültner, 2000).

Auch die Beobachtung, dass auf einen bestimmten Stimulus hin BMMC Zytokine freisetzen ohne zu degranulieren, wurde bereits in einigen anderen Experimenten gemacht. So konnte IL-6 und TNF aber keine Degranulation nach Stimulierung mit CpG-Motiv-beinhaltenden Oligodeoxynukleotiden festgestellt werden (Zhu, 2000). Auch die spezifische Stimulierung von TLR4 auf BMMC führte zu keiner Degranulation, jedoch zu Sekretion von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-13 und IL-1 $\beta$  (Supajatura, 2002).

Nach Cokultur der BMMC mit aktivierten T-Zellen wurde das gleiche Zytokinsekretionsmuster wie nach der Stimulierung mit 5G11b oder mLIGHT in Gegenwart von Ionomycin gefunden. Auch hier zeigte sich die Notwendigkeit von Costimulatoren für die LT $\beta$ R-vermittelte Zytokinfreisetzung: Die Aktivierung von T-Zellen mit PMA und Ionomycin induziert neben der Expression von LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT auch noch andere stimulatorisch wirkende Glycoproteine auf der Zelloberfläche. Für die vorher schon angesprochene Notwendigkeit eines zusätzlichen Signals neben der LT $\beta$ R-Aktivierung spricht noch folgender Sachverhalt: EL4 5D3 Zellen, die mit jeweils 100 ng/ml PMA und Ionomycin stimuliert wurden, zeigten auf der Zelloberfläche die gleiche Menge LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT wie nach Stimulierung mit je 500 ng/ml PMA und Ionomycin. Jedoch konnte bei der Cokultur dieser „weniger stimulierten“ EL4 5D3 Zellen mit BMMC keine Freisetzung von TNF und MIP-2 festgestellt werden, wohingegen IL-4, IL-6 und RANTES in messbaren Konzentrationen im Zellkulturüberstand vorhanden waren (Daten nicht gezeigt). Dies legt die Vermutung nahe, dass zusätzliche Moleküle auf der T-Zell-Oberfläche, die verschieden von LT $\alpha_1\beta_2$  und LIGHT sind, zu einer LT $\beta$ R abhängigen T-Zell – Mastzell Kommunikation beitragen. Solche zusätzlichen costimulatorischen Moleküle scheinen für die TNF- und MIP-2-Sekretion im Cokultur-Modell verantwortlich zu sein. Eine LT $\beta$ R-spezifische Freisetzung von IL-4 und IL-6 wurde auch bei der Cokultur mit anderen PMA/Ionomycin aktivierten T-Zellen, wie PMML und ESB, beobachtet (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend wird die Notwendigkeit eines unterstützenden Signals für die LT $\beta$ R-spezifische Freisetzung von Zytokinen aus Mastzellen deutlich.

Wenn LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT-exprimierende T-Zellen mit LT $\beta$ R:Ig inkubiert wurden, konnten nach anschließender Cokultur mit LT $\beta$ R +/+ BMMC nur niedrige Werte an IL-4, IL-6, TNF, MIP-2 und RANTES gemessen werden, was wiederum die LT $\beta$ R-Abhängigkeit der Kommunikation von aktivierten T-Zellen mit Mastzellen zeigt. Es wurde jedoch auch deutlich, dass es noch weitere Signalwege neben dem LT $\beta$ R geben muss, die zur Kommunikation zwischen T-Zellen und Mastzellen beitragen.

Die bisher untersuchten Mastzellen waren vor allem BMMC aus C57BL/6 Mäusen, die unter Zusatz von IL-3 und SCF kultiviert wurden. Dabei handelt es sich um Mastzellen vom

Bingegewebe-Typ (CTMC), welcher durch die Kultivierung der BMMC mit IL-3, IL-4 und SCF erhalten wird. Solche Zellen haben ein völlig anderes Zytokin-Freisetzungsprofil als MMC, welche durch Kultivierung der Knochenmarkstammzellen mit IL-3, IL-9 und IL-10 generiert werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass BMMC, die unter anderen Bedingungen kultiviert werden, nach LT $\beta$ R-Aktivierung andere Zytokine freisetzen. Hierzu sollte auch noch bedacht werden, dass BMMC, die aus anderen Mausstämmen stammen, nach LT $\beta$ R-Stimulation wiederum andere Zytokine freisetzen können.

Die nach LT $\beta$ R-Aktivierung von Mastzellen freigesetzten Zytokine stellen eine Mischung aus Zytokinen dar, die typisch für Th1- bzw. Th2-assoziierten Zytokine sind. IL-4 ist als Th2-Zytokin-Marker bekannt und besitzt eine Vielzahl von möglichen Wirkungen auf T-Zellen, B-Zellen, Mastzellen, Makrophagen und viele andere Zelltypen (Chomarat, 1998), was dazu führen könnte, dass sich T-Zellen zu Th2 T-Zellen differenzieren. Da Th2 T-Zellen bei allergischen Reaktionen eine wichtige Rolle spielen, wäre es denkbar, dass LT $\beta$ R-Aktivierung für die allergische Reaktion eine Rolle spielen könnte (Foster, 2002; Corry, 1998). Außerdem ist IL-4 neben SCF, IL-3 und IL-9 als wichtiger Mastzell-Wachstumsfaktor vor allem für Mastzellen in Darm und Lunge bekannt (Renauld, 1995; Temann, 1998). Zusätzlich sind Mastzellen eine wichtige Quelle von IL-4 bei Entzündungen (Bradding, 1992; Bradding, 1994). In diesem Zusammenhang ergibt auch die Sekretion von IL-6 nach LT $\beta$ R-Stimulierung einen Sinn, denn es wurde berichtet, dass IL-6 in Gegenwart von IL-4 in der Lage ist, T-Zellen in Richtung Th2 T-Zellen differenzieren zu lassen und dabei gleichzeitig die Differenzierung zu Th1 T-Zellen zu hemmen (Diehl, 2002). Weiterhin wird IL-6 mit der Synthese von akute-Phase-Proteinen, allergischen Erkrankungen und der Abwehr von Parasiten in Verbindung gebracht (Hirano, 1998).

Das MIP-2 ist dem humanem IL-8 homolog. Die Freisetzung von TNF und MIP-2 aus Mastzellen scheint interessant, auch wenn beide nur durch Cokultur von „relativ stark aktivierten“ T-Zellen mit BMMC produziert werden, da beschrieben wurde, dass die T-Zell-abhängige Freisetzung von MIP-2 und TNF aus Mastzellen während der DTH-Reaktion die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe kontrollieren (Biedermann, 2000). Zusätzlich gibt es noch Daten, dass TNF und MIP-2 aus Mastzellen bei Partikel-induzierter Entzündung bzw. bei oxidativen Stress eine wichtige Rolle spielen (Driscoll, 2000).

Von RANTES war schon vorher bekannt, dass es nach Aktivierung des LT $\beta$ R aus A375, einer humanen Melanomzelllinie, freigesetzt wird (Degli-Esposti, 1997). RANTES ist vor allem als proinflammatorisches Chemokin bekannt und scheint für den Übergang von der akuten zur chronischen Entzündung wichtig zu sein (Ajuebor, 2001). Darüber hinaus wurde für aus Mastzellen stammendes RANTES und IL-8 eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Basal-Zell Carzinomen gezeigt (Aoki, 2003).

Leider kann über die *in vivo* Relevanz der nach LT $\beta$ R Aktivierung freigesetzten Zytokine aus Mastzellen nur spekuliert werden, da systematische Untersuchungen in der Maus erst durchgeführt werden müssen. Es zeigt sich jedoch, dass bei der Kommunikation von T-Zellen mit Mastzellen LT $\beta$ R-Aktivierung eine wichtige Rolle als zusätzliches, costimulierendes Signal spielen kann. Vor allem bei Erkrankungen, die sowohl T-Zell- als auch Mastzell-abhängig sind, wie z.B. die DTH könnte Interaktion aktivierter T-Zellen über LT $\alpha_1\beta_2$  mit LT $\beta$ R auf Mastzellen von entscheidender Bedeutung sein. Dies trifft in gleichem Maße für die Colitis Ulcerosa zu, wo die nach LT $\beta$ R-Stimulierung freigesetzten Zytokine aus den Mastzellen, vor allem IL-6, TNF, MIP-2 und RANTES, für die Verstärkung der entzündlichen Reaktion verantwortlich sein könnten.



## **6. Zusammenfassung**

### **6.1 Die Rolle des LT $\beta$ R in der akuten DSS- induzierten Colitis**

Im Model der akuten DSS-induzierten Colitis konnte gezeigt werden, dass Behandlung mit LT $\beta$ R:Ig zu einer signifikanten Verschlimmerung der Entzündungsreaktion führt. Dies wurde anhand verschiedener Entzündungsparameter des Dickdarmes wie Histologie, histologischer Score, Ausbildung von Darm-Lymphfollikeln, Gewichtsverlust, MPO-Aktivität und Dickdarmlänge festgestellt. Die verstärkte Entzündung während der akuten DSS-induzierten Colitis nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung ging mit vermehrter mRNA für IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF im Dickdarmgewebe einher. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch vermehrte Produktion von IL-6, TNF und MIP-2 von mesenterialer Lymphozyten nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung. In gesunden Mäusen waren CD4<sup>+</sup> T- und B220<sup>+</sup> B- und zu einem sehr geringen Maße CD8<sup>+</sup> T-Zellen LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT positiv und es wurde während der akuten Phase der Colitis keine vermehrte Expression von LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT auf mesenterialen Lymphozyten beobachtet. Auch die Transkription von LT $\alpha$ , LT $\beta$ , LIGHT oder LT $\beta$ R war im Vergleich zu gesunden Mäusen in der akuten Colitis nicht verändert.

In LT $\beta$ R-/- Mäusen mit akuter Colitis zeigte sich ein ähnliches Bild wie in Mäusen, die während der akuten Phase der Colitis mit LT $\beta$ R:Ig behandelt wurden. Die Entzündung in Dickdarmbiopsien von LT $\beta$ R-/- Mäusen mit akuter Colitis war gemessen an Histologie, histologischem Score, Gewichtsverlust und Dickdarmlänge sehr deutlich ausgeprägt. Das im Vergleich mit WT-Mäusen verschlechterte Krankheitsbild in LT $\beta$ R-/- Mäusen wurde auch durch eine erhöhte IL-6 mRNA- Menge im Dickdarmgewebe bestätigt.

Fehlen oder Hemmung von LT $\beta$ R-Aktivierung in der akuten Colitis führt demnach zu einer überschießenden Entzündungsreaktion. Zusätzlich scheint es während der akuten DSS-induzierten Colitis einen LT $\beta$ R-unabhängigen Weg zur Ausbildung von lymphoiden Strukturen im Dickdarm zu geben.

### **6.2 Die Rolle des LT $\beta$ R in der chronischen DSS- induzierten Colitis**

Im Modell der chronischen DSS-induzierten Colitis bot sich ein völlig anderes Bild als in der akuten Colitis. Behandlung mit LT $\beta$ R:Ig führte zu einer signifikanten Verminderung der Manifestation der chronischen Entzündung wie durch Histologie, histologischen Score, Lymphfollikel-Score, MPO-Aktivität und Dickdarmlänge festgestellt werden konnte. Die geringere Entzündung nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung in der chronischen Colitis zeigte sich auch in einer niedrigeren Menge an mRNA für IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF in Dickdarmbiopsien. Auch die Zytokinproduktion von IL-6, TNF und MIP-2 der mesenterialen Lymphknoten aus LT $\beta$ R:Ig behandelten Tieren war vermindert. Auf mesenterialen Lymphozyten aus Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis wurde in der Durchflußzytometrie vermehrt

LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT festgestellt, wobei wieder CD4<sup>+</sup> T-, CD8<sup>+</sup> T- und B220<sup>+</sup> B-Zellen positiv für die Expression der LT $\beta$ R-Liganden waren. Mit semiquantitativer PCR konnte eine deutliche Hochregulation von LT $\beta$ -mRNA in der chronischen Form der Colitis festgestellt werden, während LT $\alpha$ -, LIGHT- und LT $\beta$ R-mRNA-Mengen unverändert waren.

Nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung von Mäusen mit chronischer Colitis wurde signifikant weniger MadCAM-1 gefunden, jedoch war  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, der MadCAM-1-Ligand, unverändert. Die reduzierte Expression von MadCAM-1 im Dickdarm von Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis nach LT $\beta$ R:Ig-Behandlung ging mit vermindertem Rollen, Anheften und Auswandern von Lymphozyten einher. Dies konnte sowohl für Sammel- und Postkapillarvenolen als auch in der Mukosa durch *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden.

In LT $\beta$ R-/- Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis entwickelte sich ebenfalls eine verminderte Entzündung im Dickdarm der Tiere im Vergleich zu Kontroll-Mäusen, was wieder durch die Histologie, histologischen Score, Lymphfollikel-Score und die Dickdarmlängen belegt wurde. Auch MadCAM-1 war in LT $\beta$ R-/- Mäusen verglichen mit Kontroll-Mäusen mit chronischer DSS-induzierten Colitis vermindert. Fehlen oder Hemmung der LT $\beta$ R-Aktivierung führte demnach zu einer verminderten Auswanderung von aktivierten Lymphozyten ins Gewebe und damit zu einer geringeren Entzündung.

Eine Behandlung von Mäusen mit chronischer DSS-induzierter Colitis mit LT $\beta$ R:Ig und anti-IFN $\gamma$  erzielte einen signifikanten additiven Effekt, der durch die unterschiedlichen Wirkmechanismen, einerseits Hemmung der Lymphozytenextravasation andererseits direkte anti-entzündliche Effekte, erklärt werden kann. Die grundsätzlich unterschiedlichen Wirkungsmechanismen einer Behandlung mit entzündungshemmenden Agentien und einer LT $\beta$ R:Ig-Blockade könnte für Kombinationstherapien bei chronischen Entzündungen genutzt werden.

### 6.3 Expression und Funktionalität des LT $\beta$ R auf BMMC

Durch FACS- und PCR-Analyse wurde LT $\beta$ R auf BMMC nachgewiesen. Spezifische Stimulierung des LT $\beta$ R auf BMMC mit einem agonistischen monoklonalen Antikörper oder mit mLIGHT in Anwesenheit von Ionomycin führte zur Freisetzung von IL-4, IL-6, TNF, MIP-2 und RANTES. Unter den verwendeten Stimulierungsbedingungen wurde keine Degranulation der Mastzellen festgestellt. Cokultur von BMMC mit aktivierten T-Zellen, die LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT auf der Zelloberfläche tragen, führte ebenfalls zur Freisetzung von IL-4, IL-6, TNF, MIP-2 und RANTES aus BMMC. Die Zytokinfreisetzung war durch Inkubation der aktivierten T-Zellen mit LT $\beta$ R:Ig hemmbar. Auch bei der Cokultur von BMMC mit aktivierten T-Zellen wurde keine Degranulation der BMMC beobachtet.

Dies zeigt, dass aktivierte T-Zellen mit  $LT\alpha_1\beta_2$ /LIGHT Mastzellen costimulatorisch über den  $LT\beta R$  zur Zytokinfreisetzung aktivieren können.

Bei der Kommunikation von aktivierten T-Zellen mit Mastzellen kann demnach  $LT\beta R$ -Aktivierung eine wichtige Rolle als zusätzliches costimulierendes Signal spielen. Vor allem bei Erkrankungen, die sowohl T-Zell- als auch Mastzell-abhängig sind, wie z.B. die DTH aber auch die Colitis Ulcerosa, könnte die Interaktion von aktivierten T-Zellen über  $LT\alpha_1\beta_2$  und dem  $LT\beta R$  auf Mastzellen von entscheidender Bedeutung sein. Die nach  $LT\beta R$ -Stimulierung freigesetzten Zytokine aus Mastzellen, vor allem IL-6, TNF, MIP-2 und RANTES, könnten, dabei für eine Verstärkung der entzündlichen Reaktionen verantwortlich sein.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abe Y, Horiuchi A, Osuka Y, Kimura S, Granger GA, and T Gatanaga. 1992. Studies of membrane-associated and soluble (secreted) lymphotoxin in human lymphokine-activated T-killer cells in vitro. *LymphokineCytokineRes.*; 11:115-121.
- Abe K, Yarovinsky FO, Murakami T, Shakhov AN, Tumanov AV, Ito D, Drutskaya LN, Pfeffer K, Kuprash DV, Komschlies KL, and SA Nedospasov. 2003. Distinct contributions of TNF and LT cytokines to the development of dendritic cells in vitro and their recruitment in vivo. *Blood*; 101:1477-1483.
- Aggarwal BB, Moffat B, and RN Harkins. 1983. *Interleukins, lymphokines and cytokines*. Academic Press, New York
- Aggarwal BB, Henzel WJ, Moffat B, Kohr J, and RN Harkins. 1985. Primary structure of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line. *J.Biol.Chem.*; 260:2334-2344
- Agyekum S, Church A, Sohail M, Krausz T, van Noorden S, Polak J, and J Cohen. 2003. Expression of lymphotoxin-beta (LT- $\beta$ ) in chronic inflammatory conditions. *J.Pathol.*; 199:115-121.
- Ajuebor MN, Hogaboam CM, Kunkel SL, Proudfoot AEI, and JL Wallace. 2001. The chemokine RANTES is a crucial mediator of the progression from acute to chronic colitis in the rat. *J.Immunol.*; 166:552-558.
- Alimzhanov MB, Kuprash DV, Kosco-Vilbois MH, Luz A, Turetskaya RL, Tarakhovsky A, Rajewsky K, Nedospasov SA, and K Pfeffer. 1997. Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin  $\beta$ -deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*; 94:9302-9307.
- Androlewicz M, Browning JL, and CF Ware. 1992. Lymphotoxin is expressed as a heterotrimeric complex with a distinct 33-kDa glycoprotein on the surface of an activated human T cell hybridoma. *J.Biol.Chem.*; 267:2542-2547.
- Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Forster R, Sedgwick JD, Browning JF, Lipp M, and JG Cyster. 2000. A chemokine driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature*; 406:309-314.
- Aoki M, Pawankar R, Niimi Y, and S Kawana. 2003. Mast cells in basal cell carcinoma express VEGF, IL-8 and RANTES. *Int.Arch.AllergyImmunol.*; 130:216-223.
- Aranda R, Sydora BC, McAllister PL, Binder SW, Yang HY, Targan SR, and M Kronenberg. Analysis of intestinal lymphocytes in mouse colitis mediated by transfer of CD4<sup>+</sup>, CD45RB<sup>high</sup> T cells to SCID recipients. *J.Immunol.*; 158:3464-3473.
- Axelsson LG, Landstrom E, Goldschmidt TJ, Gronberg A, and AC Bylund-Fellenius. 1996. Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) cell depleted, athymic and NK cell depleted SCID mice. *Inflam.Res.*; 45:181-191.
- Baens M, Chaffanet M, Cassiman JJ, Van den BH, and P Marynen. 1993. Construction and evaluation of a hncDNA library of human 12p transcribed sequences derived from a somatic cell hybrid. *Genomics*; 16:214-218.

- Banks TA, Rouse BT, Kerley MK, Blair PJ, Godfrey VL, Kuklin NA, Bouley DM, Thomas J, Kanangat S, and ML Mucenski. 1995. Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J. Immunol.*; 155:1685-1693.
- Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, and W Lesslauer. 1993. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell*; 73:431-445.
- Baumeister B, Schmidt C, Helisch A, and J Kipnowski . 1996. Increased prostaglandin E2 and leukotriene B4 synthesis in isolated colonic mucosal cells in inflammatory bowel disease. *J.Clin.Gastroenterol.*; 22:117-120.
- Bhattacharyya SP, Drucker I, Reshef T, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD, and YA Mekori. 1998. Activated T lymphocytes induce degranulation and cytokine production by human mast cells following cell-to-cell contact. *J.Leukoc.Biol.*; 63:337-340.
- Biedermann T, Kneiling M, Mailhammer R, Maier K, Sander CA, George Kollias, Kunkel SL, Hültner L, and M Röcken. Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J.Exp.Med.*; 192:1441-1451.
- Bradding P, Feather IH, Howarth PH, Mueller R, Roberts JA, Britten K, Bews JP, Hunt TC, Okayama Y, Heusser CH, Bullock GR, Church MK, and ST Holgate. 1992. Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *J.Exp.Med.*; 176:1381-1386.
- Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, Heusser CH, Howarth PH and ST Holgate. 1994. Interleukin-4,-5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cells as a source of these cytokines. *Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol.*; 10:471-480.
- Bradding P, Okayama Y, Howarth PH, Church MK, and ST Holgate. 1995. Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J.Immunol.*; 155:297-307.
- Braegger CP, and TT MacDonald. 1994. Immune mechanisms in chronic inflammatory bowel disease. *Ann.Allergy*; 72:135-141.
- Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, and G Rothstein. 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J.Invest.Dermatol.*; 78:206-209.
- Brandtzaeg P. 2001. Inflammatory bowel disease: clinics and pathology. *ActaOdontol.Scand.*; 59:235-243.
- Browning JL, Androlewicz MJ, and CF Ware. 1991. Lymphotoxin and an associated 33-kDa glycoprotein are expressed on the surface of an activated human T cell hybridoma. *J. Immunol.*; 147:1230-1237.
- Browning JL, Ngam-ek A, Lawton P, DeMarinis J, Tizard R, Chow EP, Hession C, O'Brine-Greco B, Foley SF, and CF Ware. 1993. Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell*; 72:847-856.
- Browning JL, Douglas I, Ngam-ek A, Bourdon PR, Ehrenfels BN, Miatkowski K, Zafari M, Yampaglia AM, Lawton P, and W Meier. 1995. Characterization of surface lymphotoxin forms. Use of specific monoclonal antibodies and soluble receptors. *J. Immunol.*; 154:33-46.

- Browning JL, Miatkowski K, Sizing I, Griffiths D, Zafari M, Benjamin CD, Meier W, and F Mackay. 1996. Signaling through the lymphotoxin beta receptor induces the death of some adenocarcinoma tumor lines. *J.Exp.Med.*; 183:867-878.
- Browning JL, Sizing ID, Lawton P, Bourdon PR, Rennert PD, Majeau GR, Ambrose CM, Hession C, Miatkowski K, Griffiths DA, Ngam-ek A, Meier W, Benjamin CD, and PS Hochman. 1997. Characterization of lymphotoxin-alpha beta complexes on the surface of mouse lymphocytes. *J.Immunol.* ; 159:3288-3298.
- Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, and GJ Gleich. 1988. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leukemia Research*; 12:345-355.
- Cannella B, Cross AH, and CS Raine. 1990. Upregulation and coexpression of adhesion molecules correlate with relapsing autoimmune demyelination in the central nervous system. *J.Exp.Med.*; 172:1521-1524.
- Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJ, Fiocchi C, Pizzaro TT, and F Cominelli. 1995. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J.Immunol.*; 154:2434-2440.
- Chomarat P, Rybak ME, and J Banchereau. 1998. *The Cytokine Handbook*. San Diego Academic Press: 133-174.
- Connor EM, Eppihimer MJ, Morise Z, Granger DN, and MB Grisham. 1999. Expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MadCAM-1) in acute and chronic inflammation. *J.Leukoc.Biol.*; 65:349-355.
- Corry DB, Grunig G, Hadeiba H, Kurup VP, Warnock ML, Sheppard D, Rennick DM, and RM Locksley. 1998. Requirements for allergen-induced airway hyperreactivity in T and B cell deficient mice. *Mol.Med.*; 4:344-355.
- Crowe PD, VanArsdale TL, Walter BN, Ware CF, Hession C, Ehrenfels B, Browning JL, Din WS, Goodwin RG, and CA Smith. 1994. A lymphotoxin beta specific receptor. *Science*; 264:707-710.
- Cuff CA, Schwartz J, Bergmann CM, Russel KS, Bender JR, and NH Ruddle. 1998. Lymphotoxin  $\alpha 3$  induces chemokine and adhesion molecules: insight into the role of LT $\alpha$  in inflammation and lymphoid organ development. *J.Immunol.*; 161:6853-6860.
- Cuff CA, Sacca R, and NH Ruddle. 1999. Differential induction of adhesion molecule and chemokine expression by LT $\alpha 3$  and LT $\alpha$  in inflammation elucidates potential mechanisms of mesenteric and peripheral lymph node development. *J.Immunol.*; 162:5965-5972.
- Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Schölmerich J, and V Gross. 1996. Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*; 38:216-222.
- Debard N, Sierro F, Browning J, and JP Kraehenbuhl. 2001. Effect of mature lymphocytes and lymphotoxin on the development of the follicle-associated epithelium and M cells in mouse peyer's patches. *Gastroenterology*; 120:1173-1182.
- Degli-Esposti MA, Davis-Smith T, Din WS, Smolak PJ, Goodwin RG, and CA Smith. 1997. Activation of the lymphotoxin beta receptor by cross-linking induces chemokine production and growth arrest in A375 melanoma cells. *J.Immunol.*; 158:1756-1762.

Denburg JA, Finotto S, Marshall JS, Jordana M, and J. Dolovich. 1993. Mast cells, stromal cells, and inflammation. In: The mast cell in health and disease. MA Kaliner. Marcel Dekker Inc. New York, Basel, Hong Kong. 443-446.

De Togni P, Goellner J, Ruddle NH, Streeter PR, Fick A, Mariathasan S, Smith SC, Carlson R, Shornick LP, Strauss-Schoenberger J, Russel JH, Karr R, and DD Chaplin. 1994. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science*; 264:703-707.

Diehl S, and M Rincon. 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol.Immunol.*; 39:531-536.

Dielemann LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, and CO Elson. 1994. Dextran sulfate sodium induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology*; 107:1643-1652.

Dielemann LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, and EP VanRees. 1998. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin.Exp.Immunol.*; 114:385-391.

Dohi T, Rennert PD, Fujihashi K, Kiyono H, Shirai Y, Kawanura YI, Browning JL, and JR McGhee. 2001. Elimination of colonic patches with lymphotoxin beta receptor-Ig prevents Th2 cell type colitis. *J.Immunol.*; 167:2781-2790.

Domek MJ, Iwata F, Blackmann EI, Kao J, Baker M, Vidrich A, and FW Leung. 1995. Anti-neutrophil serum attenuates dextran sulfate sodium-induced colonic damage in the rat. *Scand.J.Gastroenterol.*; 30:1089-1094.

Driscoll KE. 2000. TNF $\alpha$  and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. *Tox.Lett.*; 112-113:177-184.

Echtenacher B, Falk W, Männel DN, and PH Krammer. 1990 Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J.Immunol.*; 145:3762-3766.

Ehrlich P. 1879. Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten. *Arch.Anat.Physiol.* 3:166-169.

Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, and RH Riddell. 1995. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*; 109:1344-1367.

Endres R, Alimzhanov MB, Plitz T, Fütterer A, Kosco-Vilbois MH, Nedospasov SA, Rajewsky K, and K Pfeffer. 1999. Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin  $\beta$  receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin  $\beta$  and tumor necrosis factor by B cells. *J.Exp.Med.*; 189:159-167.

Erickson SL, de Sauvage J, Kikly K, Carver-Moore K, Pitts-Meek S, Gillet N, Sheehan KC, Schreiber RD, Goeddel DV, and MW Moore. 1994. Decreased sensitivity to tumor-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature*; 372:560-563.

Ettinger R, Browning JL, Michie SA, van Ewijk W, and HO McDevitt. 1966. Disrupted splenic architecture, but normal lymph node development in mice expressing a soluble lymphotoxin- $\beta$  receptor-IgG1 fusion protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*; 93:13102-13107.

- Faveeuw C, Gagnerault MC, and F Lepault. 1994. Expression of homing and adhesion molecules in infiltrated islets of Langerhans and salivary glands of nonobese diabetic mice. *J. Immunol.*; 152:5969-5978.
- Farkas S, Herfarth H, Rössle M, Schroeder J, Steinbauer M, Guba M, Beham A, Schölmerich J, Jauch KW, and M Anthuber. 2001. Quantification of mucosal leucocyte endothelial cell interaction by in vivo fluorescence microscopy in experimental colitis in mice. *Clin.Exp.Immunol.*; 126:250-258.
- Force WR, Walter BN, Hession C, Tizard R, Kozak CA, Browning JL, and CF Ware. 1995. Mouse lymphotoxin beta receptor. Molecular genetics, ligand binding, and expression. *J. Immunol.*; 155:5280-5288.
- Forster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, and M Lipp. 1996. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell*; 87:1037-1047.
- Foster PS, Martinez-Moczygemba M, Huston DP, and DB Corry. 2002. Interleukins-4,-5, and -13: emerging therapeutic targets in allergic disease. *Pharmacol.Ther.*; 94:253-264.
- Fu YX, and DD Chaplin. 1999. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu.Rev.Immunol*; 17:399-433.
- Fujihashi K, Dohi T, Rennert PD, Yamamoto M, Koga T, Kiyono H, and JR McGhee. 2001. Peyer's patches are required for oral tolerance of proteins. *PNAS*; 98:3310-3315.
- Fung MC, Hapel AJ, Ymer S, Cohen DR, Johnson RM, Campbell HD, and IG Yung. 1984. Molecular cloning of cDNA for murine interleukin 3. *Nature*; 307:233-237.
- Futterer A, Mink K, Luz A, Kosco-Vilbois MH, and K Pfeffer. 1998. The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity*; 9:59-70.
- Galli SJ, Dvorak AM, Marcum JA, Ishizaka T, Nabel G, Der Simonian H, Pyne K, Goldin JM, Rosenberg RD, Cantor H, and HF Dvorak. 1982. Mast cell clones: a model for the analysis of cellular maturation. *J.Cell.Biol.*; 95:435-444.
- Galli SJ. 1990. Biology of disease: new insights into "The riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab.Invest.*; 62:5-33.
- Galli SJ, and BK Wershil. 1996. The two faces of the mast cell. *Nature*; 381:21.
- Galli SJ, and M Lichtenstein. 1998. Biology of mast cells and basophils. In: *Allergy: Principles and Practice*. E. Middleton. C.V. Mosby, St. Louis; 106-134.
- Galli SJ, Maurer M, and CS Lantz. 1999. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr.Opin.Immunol.*; 11:53-59.
- Goluszko E, Hjelmstrom P, Deng C, Poussin MA, Ruddle NH, and P Christadoss. 2001. Lymphotoxin-alpha deficiency completely protects C57BL/6 mice from developing clinical experimental autoimmune myasthenia gravis. *J.Neuroimmunol.*; 113:109-108.
- Gonzalez AP, Sepulveda S, Massberg S, Baumeister R, and MD Menger. 1994. In vivo fluorescence microscopy for the assessment of microvascular reperfusion injury in small bowel transplants in rats. *Transplantation*; 58:403-408.



- Gonzalez M, Mackay F, Browning JL, Kosco-Vilbois MH, and RJ Noelle. 1998. The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles. *J.Exp.Med.*; 187:997-1007.
- Goodnow CC, and JG Cyster. 1997. Lymphocyte homing: the scent of a follicle. *Curr.Biol.*; 7:R219-R222.
- Gordon JR, and SJ Galli. 1990. Mast cells are a source of both preformed and immunologically inducible TNF- $\alpha$ /cachectin. *Nature*; 346:274-276.
- Gramaglia I, Mauri DN, Miner KT, Ware CF, and M Croft. 1999. Lymphotoxin  $\alpha\beta$  is expressed on recently activated naive and Th1-like DC4 cells but is down-regulated by IL-4 during Th2 differentiation. *J.Immunol.*; 162:1333-1338.
- Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen S, and LT Williams. 1998. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*; 95:258-263.
- Hamawy MM, Mergenhagen SE, and RP Siraganian. 1995. Protein tyrosine phosphorylation as a mechanism of signalling in mast cells and basophils. *Cell.Sigal.*; 7:535-544.
- Harris AG, Hecht R, Peer F, Nolte D, and Messmer K. 1997. An improved intravital microscopy system. *Int.J.Microcirc Clin.Exp.*; 17:322-327.
- Harrop JA, McDonnell PC, Bringham-Burke M, Lyn SD, Minton J, Tan KB, Dede K, Spanpanato J, Silverman C, Hensley P, DiPrinzio R, Emery JG, Deen K, Eichman C, Chabot-Fletcher M, Truneh A, and PR Young. 1998. Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth. *J.Biol.Chem.*; 273:27548-27556.
- Hedrick JA, and A Zlotnik. 1997. Identification and characterization of a novel beta chemokine containing six conserved cysteines. *J.Immunol.*; 159:1589-1593.
- Hehlgans T, and DN Männel. 2001. Recombinant, soluble LIGHT (HVEM-ligand) induces increased IL-8 secretion and growth arrest in A375 melanoma cells. *J.InterferonCytokine Res.*; 21:333-338.
- Hehlgans T, Stoelcker B, Stopfer P, Müller P, Cernaianu G, Guba M, Steinbauer M, Nedospasov SA, Pfeffer K, and DN Männel. 2002. Lymphotoxin-beta receptor immune interaction promotes tumor growth by inducing angiogenesis. *CancerRes*; 62:4034-4040.
- Hehlgans T, Müller P, Stopfer P, and DN Männel. 2003. Activation of the lymphotoxin-beta receptor induces NF $\kappa$ B dependent IL6 and MIP-2 secretion in mouse fibrosarcoma cells. *Eur.CytokineNetw.*; in press
- Henz BM, Maurer M, Lippert U, Worm M, and M Babaina. 2001. Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Exp.Dermatol.*; 10:1-10.
- Hirano T. 1998. Interleukin 6 and its receptor: 10 years later. *Int.Rev.Immunol.*; 16:249-284.
- Hjelmström P, Fjell J, Nakagawa T, Sacca R, Cuff CA, and NH Ruddle. 2000. Lymphoid tissue homing chemokines are expressed in chronic inflammation. *Am.J.Pathol.*; 156:1133-1138.

- Hjelmström P. 2001. Lymphoid neogenesis: de novo formation of lymphoid tissue in chronic inflammation through expression of homing chemokines. *J.Leukoc.Biol.*; 69:331-339.
- Hofmeister R, Wiegmann K, Korherr C, Bernardos K, Krönke M, and W Falk. 1997. Activation of acid sphingomyelinase by interleukin-1 (IL-1) requires the IL-1 receptor accessory protein. *J.Biol.Chem.*; 272:27730-27736.
- Hohmann RJ, and T Hultsch. 1993. Modulation of mediator release from mast cells. In: *The mast cell in health and disease*. MA Kaliner. Marcel Dekker Inc. New York, Basel, Hong Kong. 443-466.
- Hollander D, Chapter 18. In Gitnick, G (ed.): *Principles and practice of Gastroenterology and Hepatology*, 2nd edition. 1994.; 229-233.
- Honda K, Nakano H, Yoshida H, Nishikawa S, Rennert P, Ikuta K, Tamechika M, Yamaguchi K, Fukumoto T, Chiba T, and SI Nishikawa. 2001. Molecular Basis of hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of peyer's patch organogenesis. *J.Exp.Med.*; 193:621-630.
- Hültner L, and J Moeller. 1990. Mast cell growth-enhancing activity (MEA) stimulates interleukin 6 produktion in a mouse bone marrow-derived mast cell line and a malignant subline. *Exp.Hematol.*; 18:873-877.
- Hültner L, Kölsch S, Stassen M, Kaspers U, Kremer JP, Mailhammer R, Moeller J, Broszeit H, and E Schmitt. 2000. In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. *J.Immunol.*; 164:5556-5563.
- Iwasaki A, and BL Kelsall. 1999. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J.Exp.Med.*; 190:229-239.
- Karimi K, Redegeld FA, Heijadra B, and FP Nijkamp. 1999. Stem cell factor and interleukin-4 induce murine bone marrow cells to develop into mast cells with connective tissue type characteristics in vitro. *Exp. Hematol.*; 27:654-662.
- Karlinger K, Györke T, Makö E, Mester A, and Z Tarján. 2000. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Europ.J.Radiol.*; 35:154-167.
- Kato S, Hokari R, Matsuzaki K, Iwai A, Kawaguchi A, Nagao S, Miyahara T, Itoh K, Ishii H, and S Miura. 2000. Amelioration of murine experimental colitis by inhibition of mucosal addressin cell adhesion molecule-1. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*; 295:183-189.
- Kelsall B, and W Strober. 1999. Gut associated lymphoid tissue. Antigen handling and T-lymphocyte responses. In *Orga PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, and JR McGee. Mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego, 293-317.
- Kitamura Y, Go S, and S Hatanaka. 1978. Decrease of mast cells in W/W<sup>V</sup> mice and their increase by bone marrow transplantation. *Bood*; 52:447-452.
- Kitamura Y, Kasugai T, Arizono N, and H Matsuda. 1993. Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *Am.J.Med.Sci.*; 306:185-191.
- Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, Männel DN, Andus T, Schölmerich J, Gross V, Falk W. 1997. Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin.Exp.Immunol.*;107:353-358.

- Koni PA, Sacca R, Lawton P, Browning JL, Ruddle NH, and RA Flavell. 1997. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxin alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity*; 6:491-500.
- Koni PA, and RA Flavell. 1999. Lymph node germinal centers form in the absence of follicular dendritic cell networks. *J Exp Med* 1999;189:855-864.
- Kratz A, Campos-Neto A, Hanson MS, and NH Ruddle. 1996. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. *J.Exp.Med.*; 183:1461-1472.
- Kuriu A, Sonoda S, Kanakura Y, Jozaki K, Yamatodani A, and Y Kitamura. 1989. Proliferative potential of degranulated murine peritoneal mast cells. *Blood*; 74:925-929.
- Kuprash DV, Osipovich OA, Pokholok DK, Alimzhanov MB, Biragyn A, Turetskaya RL, and SA Nedospasov. 1996. Functional analysis of the lymphotoxin-beta promoter. Sequence requirements for PMA activation. *J.Immunol.*; 156:2465-2472.
- Kuprash DV, Boitschenko VE, Yarovsky FO, Rice NR, Nordheim A, Rühlmann A, and SA Nedospasov. 2002. Cyclosporin A blocks the expression of lymphotoxin  $\alpha$ , but not of lymphotoxin  $\beta$ , in human peripheral blood mononuclear cells. *Blood*; 100:1721-1727.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227:680-685.
- Lozt M, Setareh J, von Kempis, and H Schwarz. 1996. The nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family. *J. Leukoc. Biol.*; 60:1-7.
- Luther SA, Lopez T, Bai W, Hanahan D, and JG Cyster. 2000. BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and Lymphotoxin- dependent lymphoid neogenesis. *Immunity*; 12:471-481.
- Mabbot NA, Mackay F, Minns F, and ME Bruce. 2000. Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nature Medicine*; 6:719-720.
- Mackay F, Majeau GR, Hochmann PS, and JL Browning. 1996. Lymphotoxin beta receptor triggering induces activation of the nuclear factor kappaB transcription factor in some cell types. *J.Biol.Chem.*; 271:24934-24938.
- Mackay F, Majeau GR, Lawton P, Hochman PS, and JL Browning. 1997. Lymphotoxin but not tumor necrosis factor functions maintain splenic architecture and humoral responsiveness in adult mice. *Eur.J.Immunol.*; 27:3033-3042.
- Mackay F, Bourdon PR, Griffiths DA, Lawton P, Zafari M, Sizing ID, Miatkowski K, Ngam-ek A, Benjamin CD, Hession C, Ambrose CM, Meier W, and JL Browning. 1997. Cytotoxic activities of recombinant soluble murine lymphotoxin-alpha and lymphotoxin-alpha beta complexes. *J.Immunol.*; 159:3299-3310.
- Mackay F, Browning JL, Lawton P, Shah SA, Comiskey M, Bahn AK, Mizoguchi E, Terhorst C, and SJ Simpson. 1998. Both the lymphotoxin and the tumor necrosis factor pathways are involved in experimental murine models of colitis. *Gastroenterology*; 115:1464-1475.
- Mackay F, and JL Browning. 1998. Turning of follicular dendritic cells. *Nature*; 395:26-27.
- Magnusson C, and DL Vaux. 1999. Signalling by CD95 and TNF receptors: not only life and death. *Immunol.Cell.Biol.*; 77:41-46.

Mapara MY, Bargou RC, Beck C, Heilig B, Dorken B, and G Moldenhauer. 1994. Lymphotoxin-alpha/beta heterodimer is expressed on leukemic hairy cells and activated human B lymphocytes. *Int. J. Cancer*; 58:248-253

Marsters SA, Ayres TM, Skubatch M, Gray CL, Rothe M, and A Ashkenazi. 1997. Herpes virus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J. Biol. Chem.*; 272:14029-14032.

Matsumoto M, Mariathasan S, Nahm MH, Baranyay F, Peschon JJ, and DD Chaplin. 1996. Role of lymphotoxin and the type I TNF receptor in the formation of germinal centers. *Science*; 271:1289-1291.

Mauri DN, Ebner R, Montgomery RI, Kochel KD, Cheung TC, Yu GL, Ruben S, Murphy M, Eisenberg RJ, Cohen GH, Spear PG, and CF Ware. 1998. LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands of the herpesvirus entry mediator. *Immunity*; 8:21-30.

Maximow A. 1906. Über die Zellformen des lockeren Bindegewebes. *Arch. Mikroskop.Anat.Entw.Mech.*; 67:680-757.

Millet I, and NH Ruddle. 1994. Differential regulation of Lymphotoxin (LT), lymphotoxin-beta (LT-beta), and TNF alpha in murine T cell clones activated through the TCR. *J. Immunol.*; 152: 4336-4346.

Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, and PG Spear. 1996. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell*; 87:427-436.

Mooij P, de Wit HJ, and HA Drexhage. 1993. An excess of dietary iodine accelerates the development of a thyroid- associated lymphoid tissue in autoimmune prone BB rats. *Clin. Immunol.Immunopathol.*; 69:189-198.

Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, VanArsdale T, CF Ware, and E Kieff. 1995. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell*; 80:389-399

Murata Y, Ishiguro Y, Itoh J, Munakata A, Yoshida T. 1995. The role of proinflammatory and immunoregulatory cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis. *J.Gastroenterol.*; 30:56-60.

Murphy M, Walter BN, Pike-Nobile L, Fanger NA, Guyre PM, Browning JL, Ware CF, and LB Epstein. 1998. Expression of the lymphotoxin beta receptor on follicular stromal cells in human lymphoid tissues. *CellDeathDiffer.*; 5:497-505.

Murthy S, Yun E, Brill K, and Cooper H. 1991. Plasma Thromboxane (TXB2) levels are preferentially increased during the acute phase of dextran sulfate mediated colitis in mice. *Gastroenterology*; 100:A602.

Murthy S, Cooper H, Shim H, Shah RS, Ibrahim SA, and DJ Sedergran. 1993. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. *Dig.Dis.Sci.*; 38:1722-1734.

Nabel G, Galli SJ, Dvorak AM, Dvorak HF, and H Cantor. 1981. Inducer T lymphocytes synthesize a factor that stimulates proliferation of cloned mast cells. *Nature*; 291:332-334.

Nagao K, Yokoro K, and SA Aaronson. 1981. Continuous lines of basophil/mast cells derived from normal mouse bone marrow. *Science*; 212:333-335.

Naismith JH, and SR Sprang. 1995. Tumor necrosis factor receptor superfamily. *J.Inflamm.*; 47:1-7.

Nakamura T, Tashiro K, Nazarea M, Nakano T, Sasayama S, and T Honjo. 1995. The murine lymphotoxin- $\beta$  receptor cDNA: isolation by the signal sequence trap and chromosomal mapping. *Genomics*; 30:312-319.

Nakano T, Sonoda T, Hayashi C, Yamatodani A, Kanayama Y, Yamamura T, Asai H, Yonezawa Y, Kitamura Y, and SJ Galli. 1985. Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell deficient W/W<sup>V</sup> mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *J.Exp.Med.*; 162:1025-1043.

Nakano H, Oshima H, Chung W, Williams-Abbott L, Ware CF, Yagita H, and K Okumura. 1996. TRAF5, an activator of NF- $\kappa$ B and putative signal transducer of the lymphotoxin-beta receptor. *J.Biol.Chem.*; 271:14661-14664.

Neumann BA, Luz A, Pfeffer K, and B Holzmann. 1996. Defective Peyer's Patch organogenesis in mice lacking the 55-kD receptor for tumor necrosis factor. *J.Exp.Med.*; 184:259-264.

Neurath MF, Fuss I, Pasparakis M, Alexopoulou L, Haralambous S, Meyer zum Buschfenfelde KH, Strober W, and G Kollias. 1997. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur.J.Immunol.*; 27:1743-1750.

Newberry RD, McDonough JS, McDonald KG, and RG Lorenz. 2002. Postgestational Lymphotoxin/Lymphotoxin  $\beta$  receptor interactions are essential for the presence of intestinal B lymphocytes. *J.Immunol.*; 168:4988-4997.

Ngo VN, Tang LH, and JG Cyster. 1998. EBI-1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J.Exp.Med.*; 188:181-191.

Ngo VN, Korner H, Gunn MD, Schmidt KN, Riminton DS, Cooper MD, Browning JL, Sedgwick JD, and JG Cyster. 1999. Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen. *J.Exp.Med.*; 189:403-412.

Ni J, and D Hollander. 1996. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut*; 39:234-241.

Norrby K, and D Wolly. 1993. Role of mast cells in mitogenesis and angiogenesis in normal tissue and tumor tissue. *Adv.Biosci.*; 71-116.

Nutmann T. 1993. Mast cells and their role in parasitic helminth infection. In: The mast cell in health and disease. MA Kaliner. Marcel Dekker Inc. New York, Basel, Hong Kong. 669-686.

Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W. 1999. Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin.Exp.Immunol.*; 116:238-245.

Ohshima Y, Yang LP, Avice MN, Kurimoto M, Nakajima T, Sergerie M, Demeure CE, Sarfati M, and G Delespesse. 1999. Naive human DC4<sup>+</sup> T cells are a major source of lymphotoxin alpha. *J.Immunol.*; 162:3790-3794.

Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, and R Nakaya. 1990. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*; 98:694-702.

Paul NL, and NH Ruddle. 1998. Lymphotoxin. *Annu.Rev.Immunol.*; 6:407-438.

Pauli U. 1994. Control of tumor necrosis factor gene expression. *Crit.Rev.Eukaryot.Gene Expr.*; 4:323-344.

Picarella D, Hurlbut P, Rottmann J, Shi X, Butcher E, and DJ Ringler. 1997. Monoclonal antibodies specific for beta 7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MadCAM-1) reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45Rbhigh CD4<sup>+</sup> T cells. *J.Immunol.*; 158:2099-2106.

Plaut M, Pierce JH, Watson CJ, Hanley-Hyde J, Nordan RP, and WE Paul. 1989. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of FcεRI or to calcium ionophores. *Nature*; 339:64.

Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, and TW Max. 1993. Mice deficient for the 55 kD tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell*; 73:457-467.

Pokholok DK, Maroulakou IG, Kuprash DV, Alimzhanov MB, Kozlov SV, Novobrantseva TI, Turetskaya RL, Green E, and SA Nedospasov. 1995. Cloning and expression analysis of the murine LTβ gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*; 92:674-678.

Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, and RL Coffman . 1994. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45Rghi CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunity*; 1:553-562.

Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, Podolsky DK, Sands BE, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, and SJ vanDeventer. 1999. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N.Engl.J.Med.*; 340:1398-1405.

Prinz M, Montrasio F, Klein MA, Schwarz P, Priller J, Odermatt B, Pfeffer K, and A Aguzzi. 2002. Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *PNAS*; 99:919-924.

Ravetch VJ, and S Bolland. 2001. IgG Fc receptors. *Annu.Rev.Immunol.*; 19:275-90.

Razin E, Cordon-Cardo C, and RA Good. 1981. Growth of a pure population of mouse mast cells in vitro with conditioned medium derived from concanavalin A stimulated splenocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*; 78:2559-2561.

Razin E, Pecht I, and J Rivera. 1995. Signal transduction in the activation of mast cells and basophils. *Immunol.Today*; 16:370-373.

Renauld JC, Kermouni A, Vink A, Louahed J, and J VanSnick. 1995. Interleukin 9 and its receptor: involvement in mast cell differentiation and T cell oncogenesis. *J.Leukoc.Biol*; 57:353-360.

- Rennert PD, Browning JL, Mebius R, Mackay F, and PS Hochman. 1996. Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs. *J.Exp.Med*; 184:1999-2006.
- Rennert PD, Browning JL, and PS Hochman. 1997. Selective disruption of lymphotoxin ligands reveals a novel set of mucosal lymph nodes and unique effects on lymph node cellular organization. *Int.Immunol.*; 9:1627-1639.
- Rennert PD, James D, Mackay F, Browning JL, and PS Hochman. 1998. Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin  $\beta$  receptor. *Immunity*; 9:71-79.
- Rothe MJ, Nowak M, and FA Kerdel. 1990. Continuing medical education: the mast cell in health and disease. *J.A.Acad.*; 23:615-624.
- Rothe J, Lesslauer W, Lotscher H, Lang Y, Koebel P, Kontgen F, Althage A, Zinkernagel R, Steinmetz M, and H Bluethmann. 1993. Mice lacking the tumor necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*; 364:798-802.
- Sacca R, Kratz A, Campos-Neto A, Hanson MS, and NH Ruddle. 1995. Lymphotoxin: from chronic inflammation to lymphoid organs. *J.Inflam.*; 47:81-84.
- Sartor RB. 1990. Role of intestinal microflora in initiation and perpetuation of inflammatory bowel disease. *Can.J.Gastroenterol.*; 4:271-277.
- Sartor RB, in: Schölmerich J, Kruis W, Goebell H, Hohenberger W and V Gross. 1992. Inflammatory bowel disease: pathophysiology as basis of treatment. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht; 175-187.
- Sartor RB. 1997. Role of the enteric microflora in the pathogenesis of intestinal inflammation and arthritis. *Aliment.Pharmacol.Ther.*; 11:17-22.
- Sartor RB. 1997. The influence of normal microbial flora on the development of chronic mucosal inflammation. *Res. Immunol.*; 148:567-576.
- Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, and A Raedler. 1995. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*; 108:1434-1444.
- Scott T, and M Kaliner. 1993. Mast cells in asthma. In: The mast cell in health and disease. MA Kaliner. Marcell Dekker Inc. New York, Basel, Hong Kong, 575-608.
- Shanahan F. 2001. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology*; 120:622-635.
- Smith CA, Farrah T, and RG Goodwin. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*; 76:959-962.
- Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*; 98:503-517.
- Spahn TW, Herbst H, Rennert PD, Luger N, Maaser C, Kraft M, Fontana A, Weiner HL, Domschke W, and T Kucharzik. 2002. Induction of Colitis in mice deficient of peyer's patches and mesenteric lymph nodes is associated with increased disease severity and formation of colonic lymphoid patches. *Am.J.Pathol.*; 161:2273-2282.

Staropoli I, Frenkiel MP, Megret F, and V Deubel. 1997. Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice. *Vaccine*; 15:1946-1954.

Stassen M, Arnold M, Hültner L, Müller C, Neudörfl C, Reinecke T, and E Schmitt. 2000. Murine bone marrow-derived mast cells as potent producers of IL-9: costimulatory function of IL-10 and kit ligand in the presence of IL-1. *J.Immunol.*; 164:5549-5555.

Stassen M, Müller C, Arnold M, Hültner L, Klein-Hessling S, Neudörfl C, Reinecke T, Serfling E, and E Schmitt. 2001. IL-9 and IL-13 production by activated mast cells is strongly enhanced in the presence of lipopolysaccharide: NF- $\kappa$ B is decisively involved in the expression of IL-9. *J.Immunol.*; 166:4391-4398.

Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, and H Ogawa. 2002. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J.Clin.Invest.*; 109:1351-1359.

Tanabe S, Lu Z, Luo Y, Quackenbush EJ, Berman MA, Collins-Racie LA, Mi S, Reilly C, Lo D, Jacobs KA, and ME Dorf. 1997. Identification of a new mouse  $\beta$ -chemokine, thymus-derived chemotactic agent 4, with activity on T lymphocytes and mesangial cells. *J.Innumol.*; 159:5671-5679.

Tamaru T, Kobayasi H, Kishimoto S, Kajiyama G, Shimamoto F, and WR Brown. 1993. Histochemical study of colonic cancer in experimental colitis in rats. *Dig.Dis.Sci.*; 38:529-537.

Temano UA, Geba GP, Rankin JA, and RA Flavell. 1998. Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *J.Exp.Med.*; 188:1307-1320.

Towbin H, Staehelin T, and J Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Pro.Natl. Acad.Sci.USA*; 76:4350-4354.

Torii I, Morikawa S, Harada T, and Y Kitamura. 1993, Two distinct types of cellular mechanisms in the development of delayed hypersensitivity in mice: requirement of wither mast cells or macrophages for elicitation of the response. *Immunology*; 78:482-490.

Torii I, Morikawa S, and T Harada. 2002. MD41, a novel T helper 0 clone, mediates mast-cell dependent delayed-type hypersensitivity in mice. *Immunology*; 102:426-434.

Trier JS, and HS Winter. 1993. Anatomy, embryology, and development abnormalities of the small intestine and colon. In Sleisinger and Fordtan : *Gastrointestinal disease*, 5<sup>th</sup> edition. Saunders WB, company, Philadelphia, Pennsylvania. 793-810.

VanArsdale TL, VanArsdale SL, Force WR, Walter BN, Mosialos G, Kieff E, Reed JC, and CF Ware. 1997. Lymphotoxin-  $\beta$  receptor signaling complex. Role of tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 recruitment in cell death and activation of nuclear factor kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 94:2460-2465.

VanAsche G, and P Rutgeerts. 2002. Antiadhesion molecule therapy in inflammatory bowel disease. *Infl.Bowel Disease*; 8:291-300.

Wang J, Lo JC, Foster A, Yu P, Chen HM, Wang Y, Tamada K, Chen L, and XY Fu. 2001. The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell-derived LIGHT. *J.Clin.Invest.*; 108:1771-1780.



Wang Y, Wang J, Sun Y, Wu Q, and YX Fu. 2001. Complementary effects of TNF and lymphotoxin on the formation of germinal center and follicular dendritic cells. *J.Immunol.*; 166:330-337.

Ware CF, Crowe PD, Grayson MH, Androlewicz MJ, and JL Browning. 1992. Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells. *J. Immunol.*; 149:3881-3888.

Ware CF, VanArsdale TL, Crowe PD, and JL Browning. 1995. The ligands and receptors of the lymphotoxin system. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*; 198:175-218.

Watanabe C, Miura S, Hokari R, Teramoto K, Ogino T, Komoto S, Hara Y, Koseki S, Tsuzuki T, Nagata H, Granger DN, and H Ishii. 2002. Spatial heterogeneity of TNF- $\alpha$  induced T cell migration to colonic mucosa is mediated by MadCAM-1 and VCAM-1. *Am.J.Physiol.Gastrointest.LiverPhysiol.*; 283:G1379-G1387.

Williams-Abbott L, Walter BN, Cheung TC, Goh CR, Porter AG, and CF Ware. 1997. The lymphotoxin-alpha (Ltalpha) subunit is essential for the assembly, but not for the receptor specificity, of the membrane-anchored Ltalpha1beta2 heterotrimeric ligand. *J. Biol. Chem.*; 272: 19451-19456.

Wittig BM, Duchmann R, Stallmach A, Zeitz M. 2001. Modulation von Zytokinen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. *Der Internist*; 42:47-54.

Yamada M, Ohkusa T, and I Okayasu . 1992. Occurrence of dysplasia and adenocarcinoma after experimental chronic ulcerative colitis in hamsters induced by dextran sulphate sodium. *Gut*; 33:1521-1527.

Yasukawa M, Yakushijin Y, Hasegawa H, Miyake M, Hitsumoto Y, Kimura S, Takeuchi N, and S Fujita. 1993. Expression of perforin and membrane-bound lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) in virus-specific DC4+ human cytotoxic T-cell clones. *Blood*; 81:1527-1534.

ZhaiY, Guo R, Hsu TL, Yu GL, Ni J, Kwon BS, Jiang GW, Lu J, Tan J, Ugustus M, Carter K, Rojas L, Zhu F, Lincoln C, Endress G, Xing L, Wang S, Oh KO, Gentz R, Ruben S, Lippmann ME, Hsieh SL, and D Yang. 1998. LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer. *J.Clin.Invest.*; 102:1142-1151.

Zhu FG, and JS Marshall. 2000. CpG-containing oligodeoxynucleotides induce TNF- $\alpha$  and IL-6 production but no degranulation from murine bone marrow-derived mast cells. *J.Leukoc.Biol.*; 69:253-262.

## **8. Abkürzungen**

ABTS	2'2-Azino-di(3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure(6))
AP	Alkalische Phosphatase
BLC	B Lymphocyte Chemoattractant
BMMC	<u>B</u> one <u>M</u> arrow-Derived <u>M</u> ast <u>C</u> ells ( vom Knochenmark abstammende primäre murine Mastzellen)
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen
CTMC	Connective Tissue Mast Cells
DAB	Diamminobenzidin
DD	Death Domain
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DSS	Dextran Sulfate Sodium
ELC	EBV-induced molecule 1 LigandChemokine
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
FDC	Follicular Dendritic Cell
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
h	Stunde
HEV	High Endothelial Venules
HRP	Horseradish Peroxidase
HVEM	Herpes virus entry mediator
ICAM-1	Intercellular Cell Adhesion Molecule-1
IDDM	Insulin Dependent Diabetes Mellitus
IFN $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kD	kilo Dalton
LIGHT	Homologous to Lymphotoxins, exhibits inducible expression, and competes with HSV <b>g</b> lycoprotein D for <b>H</b> VEM, a receptor expressed by <b>T</b> lymphocytes
LT	Lymphotoxin
LT $\beta$ R	Lymphotoxin- $\beta$ Rezeptor
MadCAM-1	Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule-1
MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein 2
MMC	Mucosal Mast Cells
mRNA	messenger RNA
NF $\kappa$ B	Nuklear Faktor $\kappa$ B
NIK	NF $\kappa$ B Inducing Kinase

## Abkürzungen

---

PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PNA	Peanut Agglutinin
PNAd	Peripheral Node Addressin
POX	Peroxidase
RANTES	<u>R</u> egulated upon <u>A</u> ctivation, <u>N</u> ormal <u>T</u> cell <u>E</u> xpressed and <u>S</u> ecreted
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
s.c.	subcutan
SCID	Severe Combined Immune Deficient
SCF	Stem Cell Factor
SD	Standard Deviation
SLC	Secondary Lymphoid Tissue Chemokine
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TRAF	<b>T</b> umor necrosis factor <b>r</b> eceptor <b>a</b> ssociated <b>f</b> actor
Tween	Polyoxyethylensorbitmonolaurat
ün	über Nacht
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
WT	Wildtyp

## **9. Danksagung**

Bei allen, die mir beim Anfertigen dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken:

Bei Frau Prof. Dr. Daniela Männel für die Überlassung eines wirklich hoch interessanten Themas. Darüber hinaus für die kontinuierliche Unterstützung, das entgegengebrachte Vertrauen und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Die stete Diskussionsbereitschaft und die konstruktiven Lösungsvorschläge während der „Dienstagsbesprechungen“ haben zum großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Armin Buschauer möchte ich für die Bereitschaft die fakultätsinterne Vertretung dieser Dissertation zu übernehmen danken, was mir diese Promotion erst ermöglichte.

Herrn PD Dr. Thomas Hehlhans möchte ich in diesem Zusammenhang ganz besonders für die gute Zusammenarbeit im Labor und für jegliche Art der Unterstützung danken.

Herrn Prof. Dr. Werner Falk danke ich für wichtige Tips zum Modell der DSS-induzierten Colitis und Florian Obermeier für die Unterstützung beim histologischen Scoring der Dickdarmschnitte.

Mein herzlicher Dank geht auch an alle „noch“ und „nicht mehr“ Mitglieder der Arbeitsgruppe Männel. Es hat täglich Spaß gemacht in dieser Atmosphäre zu arbeiten. Wir haben viel zusammen gelacht, wodurch man über so manches nicht gelungene Experiment leichter hinwegkam. An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank den Teilnehmern des donnerstäglichen „Gingerino-Treffen“.

Zu guter letzt möchte ich meinen Eltern danken, die mich seit Beginn meines Studiums und auch während der Promotion hinweg bestens unterstützt haben.

## **10. Publikationen**

Hehlhans T, Stoelcker B, Stopfer P, Müller P, Cernaianu G, Guba M, Steinbauer M, Nedospasov SA, Pfeffer K, Männel DN. Lymphotoxin-beta receptor immune interaction promotes tumor growth by inducing angiogenesis. Cancer Res.; 62:4034-4040

Hehlhans T, Müller P, Stopfer P, Männel DN. Activation of the lymphotoxin-beta receptor induces NF $\kappa$ B dependent IL6 and MIP-2 secretion in mouse fibrosarcoma cells. Eur. Cytokine Netw. In Press

Stopfer P, Männel DN, Hehlhans T. LT $\beta$ R activation by stimulated T cells induces cytokine from murine bone marrow-derived mast cells. J. Exp. Med. Manuskript eingereicht

Stopfer P, Obermeier F, Dunger N, Falk W, Farkas S, Janotta M, Möller A, Männel DN, Hehlhans T. Blocking of lymphotoxin- $\beta$  receptor pathway in chronic colitis causes downregulation of MadCAM-1 and reduced leucocyte endothelial cell interaction. Gastroenterology Manuskript eingereicht

Stopfer P, Obermeier F, Dunger N, Falk W, Möller A, Männel DN, Hehlhans T. Lymphotoxin- $\beta$  receptor blockade in acute colitis leads to exacerbation of inflammation. Manuskript in Vorbereitung

### **Präsentationen:**

Kurzvortrag bei der Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, 2001 in Innsbruck : „Activation of the LT $\beta$ R pathway has a protective role in the acute form of ulcerative colitis“

Kurzvortrag bei der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, 2001 in Dresden: „Lymphotoxin- $\beta$  receptor pathway is critical for colitis“

Kurzvortrag bei der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, 2002 in Marburg: „Lymphotoxin- $\beta$  receptor activation is critical in acute and chronic form of colitis“

### **Poster:**

Posterpräsentation bei der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, 2001 in Dresden: „Lymphotoxin- $\beta$  receptor pathway is critical for colitis“

Posterpräsentation bei der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, 2002 in Marburg: „Lymphotoxin- $\beta$  receptor activation is critical in acute and chronic form of colitis“

Posterpräsentation beim „Joint Meeting of the International Cytokine Society and European Cytokine Society“, 2002 in Turin: “Lymphotoxin- $\beta$  receptor activation is critical in colitis”

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

.....

Peter Stopfer